

Aus der Klinik und Poliklinik für Strahlentherapie und
Röntgendiagnostik
(Direktor: Prof. Dr. F. Heß)
am Radiologiezentrum der Universität Marburg/Lahn
(Direktoren: Prof. Dr. Dr. E.H. Graul und Prof. Dr. F. Heß)

Veränderungen der Laktatdehydrogenase in den Gewebsfraktionen beim Walker-Carcinom unter der Bestrahlung

INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung des Doktorgrades
der gesamten Medizin

dem Fachbereich Humanmedizin der
Philipps-Universität zu Marburg

vorgelegt von

Wilhelm Schultheis
aus Langenselbold

Marburg 1972

Druck: Görich & Weiershäuser, Marburg

Aus der Klinik und Poliklinik für Strahlentherapie und
Röntgendiagnostik
(Direktor: Prof. Dr. F. Heß)
am Radiologiezentrum der Universität Marburg/Lahn
(Direktoren: Prof. Dr. Dr. E.H. Graul und Prof. Dr. F. Heß)

Veränderungen der Laktatdehydrogenase in den Gewebsfraktionen beim Walker-Carcinom unter der Bestrahlung

INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung des Doktorgrades
der gesamten Medizin

dem Fachbereich Humanmedizin der
Philipps-Universität zu Marburg

vorgelegt von

Wilhelm Schultheis
aus Langenselbold

Marburg 1972

Druck: Görich & Weiershäuser, Marburg



Angenommen vom Fachbereich Humanmedizin
der Philipps-Universität Marburg am 19. Dezember 1972

gedruckt mit Genehmigung des Fachbereiches

Dekan: Prof. Dr. med. H. Oepen

Referent: Prof. Dr. med. F. Heß

Correferent: Prof. Dr. med. Klaus

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
I. EINLEITUNG	1
II. DIE LDH UND IHRE ISOENZYME	3
1. Biochemische und strukturelle Eigenschaften der LDH	3
2. Hybridtheorie der LDH, die sogenannten Isoenzymmuster	3
3. Der LDH-Zyklus	7
4. Die Beziehungen der LDH und ihrer Isoenzyme zu einigen Tumoreigenschaften	8
5. Biochemische Veränderungen unter der Anwendung ionisierender Strahlen	9
III. FRAGESTELLUNG	11
IV. MATERIAL UND METHODE	12
1. Versuchstiere und Tumor	12
2. Gewebeaufbereitung	13
a) Totalhomogenat	13
b) Schrittweise Gewebsdisintegration	14
c) Gewinnung einer Kernfraktion	14
3. Vorbereitung zu den Enzymbestimmungen	20
4. Vorbereitung zu den Isoenzymbestimmungen	21
5. Auswertung der Isoenzyme	22
V. ERGEBNISSE	28
VI. AUSWERTUNG	33
VII. DISKUSSION	53
VIII. ZUSAMMENFASSUNG	61
IX. LITERATURVERZEICHNIS	63



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41553805_0041

I. EINLEITUNG

Die frühe Krebsentstehungstheorie WARBURGS, der ursächlich eine Schädigung der mitochondrialen Zellatmung annimmt, unter der es zu einem Stoffwechselatavismus mit überwiegender Energiegewinnung durch Glykolyse kommt, die die Kanzerisierung der Zelle einleitet (176,176a,178,178a), entfachte mit der darin enthaltenen Bedeutung der Laktatdehydrogenase für die Glykolyse einen großen Forschungsseifer aller sich mit dem Krebsproblem befassenden theoretisch- und praktisch-medicinischen Fachrichtungen. Weit mehr als 500 Veröffentlichungen in den letzten 30 Jahren allein im deutschen Sprachraum geben dies zahlenmäßig wieder. Die praktische Medizin versprach sich von der Bestimmung der LDH, die nach den Ergebnissen WARBURGS und anderer Autoren (35,45,65,66,73,74,76,102,115) regelmäßig in tierischen und menschlichen Tumoren erhöht vorgefunden wurde, ein einfaches Mittel zur Krebsdiagnostik. Diese Erwartungen konnten jedoch infolge mangelnder Spezifität der LDH einerseits - so ist sie z.B. beim Herzinfarkt, Leber- und Bluterkrankungen und bei fiebrigen Infektionskrankheiten erhöht - und nachgewiesenem Fehlen erhöhter Glykolyse in vielen tierischen und menschlichen Tumoren andererseits (11,16,17,18,57) nicht erfüllt werden.

Neuen Aufschwung nahm die Forschung nach Entdeckung der LDH-Isoenzyme und ihrer Formulierung durch MARKERT (103). Spezies-spezifische und organspezifische Isoenzymmuster wurden aufgestellt, ihre Entwicklung während der Ontogenese untersucht (44,80,82, 91-95,105,113,119-23) und der Versuch unternommen, sie entwicklungsgeschichtlich und nach Stoffwechselgesichtspunkten zu deuten (30,81,155,172,173,197).

Die Konvergenzhypothese GREENSTEINS (56,57), nach der spezielle Zellfunktionen zugunsten der alleinigen Bedürfnisse zur

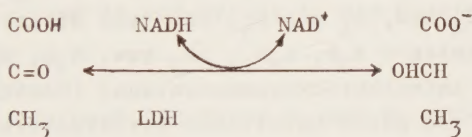
Zellreplikation aufgegeben werden, so daß eine enzymatische Uniformität der Zellen verschiedener Tumoren untereinander und zunehmende Unähnlichkeit der Enzymausstattung der Tumoren mit dem ehemaligen Matrixgewebe resultieren, ließen an die Möglichkeit denken, tumorspezifische LDH-Muster feststellen zu können. Tatsächlich beobachteten mehrere Autoren unter der Krebsentwicklung den Verlust organspezifischer Isoenzymmuster mit Bevorzugung der kathodischen Fraktionen (38,51,156) und brachten dieses Verhalten mit der veränderten Stoffwechsellage der Tumoren in Zusammenhang. Andere Autoren sprechen von regelrechten Isoenzymmustern, die tumorspezifisch auch im Serum erscheinen sollen (201).

II. DIE LDH UND IHRE ISOENZYME

1. Biochemische und strukturelle Eigenschaften der LDH

Die LDH, 1940 zuerst von STRAUB, dann von KUBOWITZ und OTTE kristallin dargestellt, hat je nach Untersucher und Methode ein Mol.Gew. zwischen 115 000 und 153 000 (71,77,119). Für die enzymatische Wirksamkeit sind durch Quecksilber- und andere Verbindungen hemmbare und durch Zystein regenerierbare Sulfhydrylgruppen von entscheidender Bedeutung (60,70, 71,138). Die Umsatzreaktion Pyruvat-NADH-Laktat erfolgt nach einem modifizierten THEORELL-CHANCE-Mechanismus aus einem ternären Komplex heraus (47,207). Allgemein wird L-Laktat als adäquates Substrat der LDH angesehen, doch gibt es auch die Meinung, daß D-Laktat ebenso geeignet sein soll: "D-Lactate is as good a substrate as L-Lactate for the lactic dehydrogenase of the rabbit erythrocytes" (117).

Die von der LDH katalysierte Reaktion lautet:



(NAD-Oxidoreduktase)

2. Hybridtheorie der LDH, die sogenannten Isoenzymmuster

Kristalline LDH wurde erstmals 1950 von MEISTER (108) und 1952 von NEILANDS (114) in zwei Fraktionen aufgetrennt. In der Folgezeit berichteten mehrere Autoren über die Existenz von drei und mehr LDH-Formen im Gewebe und Serum, die mit

unterschiedlichen präparativen Techniken gewonnen worden waren. 1959 identifizierten MARKERT und MÖLLER mehrere LDH-Banden in Säugetiergeweben mit der Methode der Stärkegelelektrophorese und lokalisierten die Enzymaktivitäten mit histochemischen Techniken (105). Die betonten die biologische Bedeutung der enzymatischen Heterogenität und schlugen den Begriff "Isozym" vor, um die verschiedenen Formen eines Enzyms im Gewebe einer Spezies zu bezeichnen. Untersuchungen von WIELAND, PFLEIDERER, HAUPT und WÖRNER (191), WIEME (194) sowie PLAGEMANN, GREGORY und WROBLEWSKI 1960 (123) haben alle die Existenz von fünf LDH Fraktionen aufgezeigt.

APPELLA und MARKERT zeigten 1961 (10), daß jede der LDH-Isoenzyme aus vier Polypeptidketten zusammengesetzt ist. Dies zusammen mit der Kenntnis, daß die meisten Gewebe fünf Isoenzyme enthalten, bewog sie zu der Annahme, die Isoenzyme seien Tetramere, die durch zufällige Assoziation zweier Polypeptiduntereinheiten entstanden. MARKERT bezeichnete 1962 diese Untereinheiten mit A und B (103), KAHN, CAPLAN, LEVINE und ZWILLING zur gleichen Zeit mit M und H (30). Die Tetramere können demzufolge aus identischen Polypeptidketten zusammengesetzt sein - A_4 , B_4 bzw. M_4 und H_4 , oder aus nichtidentischen, Hybride genannten - A_3B , A_2B_2 , AB_3 bzw. M_3H , M_2H_2 , MH_3 . Unterschiede in der Aminosäurezusammensetzung (MARKERT 1963, 104), das Auffinden von durch Mutationen hervorgerufenen Isoenzymformen (SILAW und BARTO (149), BOYER, FAINER-WILLIAMS und NANCE, CLAFLIN und SMITHIES alle 1963 (24,112), sowie Ploidieuntersuchungen von WACHSMUTH u.a. (171) erbrachten den Beweis für die Existenz zweier Genorte, die für die LDH-Enzymsynthese verantwortlich sind. Untersuchungen an reifen Testes und Sperma machten jedoch das Vorliegen eines weiteren allelen Gens (neben A und B) C wahrscheinlich (18). Das Vorfinden multipler "Subbanden" konnte mit der Hybridtheorie und deren genetischem Hintergrund nicht in Einklang gebracht werden. Eine Erklärung dafür wurde vorwiegend in Milieufaktoren gesucht (89,90,132).

Die Isoenzyme unterscheiden sich bei gleichem Molekulargewicht, gleicher Molekülkonfiguration und gleicher katalysierter Reaktion neben anderm vornehmlich durch Substrat- und Produkthemmbarkeit, Affinität zu NAD-Analogen, pH-Optimum, pk-Wert, Aminosäuresequenz, thermische Inaktivierbarkeit, Umsatzverhalten gegenüber alpha-Hydroxybutyrat, Hemmbarkeit durch Oxamat und Oxalat und durch ihre immunologischen Eigenschaften (50,51,58,59,61,70,71,77,89,92,97,114,118,119,133,141,142,155,166,167,169,172-74,190,191,193,194,196-99,205).

Die pk-Verschiedenheit, bedingt durch differente Aminosäurezusammensetzung, ermöglicht ihre Trennung im elektrischen Feld, z.B. durch Agargelelektrophorese. Die am schnellsten wandernde, anodische Fraktion ist identisch mit H_4 , die langsamste, am weitesten kathodisch anzutreffende Fraktion mit M_4 . Die Hybride liegen ihrem M- bzw. H-Anteil gemäß dazwischen. Klinische Bedeutung hat noch die HBDH erlangt, so genannt, weil von ihr alpha-Hydroxybutyrat als Substrat umgesetzt wird. Sie ist weitgehend identisch mit den anodischen Fraktionen I und II und spielt in der Herzinfarktdiagnostik eine Rolle.

Die beiden "reinen" LDH-Typen H_4 und M_4 wurden von STAMBAUGH und POST als zwei verschiedenen Stoffwechseltypen zugehörig gegenübergestellt: H_4 sei ein unter aeroben Bedingungen arbeitendes Enzym, während M_4 der anaeroben Glykolyse zuzuordnen sei. Diese Aussagen, insbesondere die über differente Substratinhibition, auf denen sie beruhen, sind nicht unwidersprochen geblieben (155,162,169). WILSON u.a. machten diese Theorie sehr plausibel. In einem systematischen Vergleich von LDH-Typen in den Flugmuskeln vieler Vögel und ihrem Flugverhalten konnten sie zeigen, daß auf langen Flug eingerichtete Sturmvögel vorwiegend H_4 -LDH, Fasane und Hühner, die nur ge-

legentlich und kurz fliegen, M_4 -LDH aufweisen. Ähnliche Verhältnisse finden sich auch an menschlichen Muskeln. Der gut durchblutete und keine Sauerstoffschuld eingehende Herzmuskel besitzt H_4 (=Heart), die auf Entfaltung von Leistungsspitzen eingerichtete und eine Sauerstoffschuld eingehende Skelettmuskulatur M_4 (M=Muscle) (197). Vergleichende Analysen der Aminosäurezusammensetzung der H-LDH und M-LDH vom Menschen und verschiedene Säugetieren durch WACHSMUTH u.a. deuteten darauf hin, daß der M-Typ phylogenetisch sehr lange besteht; die Mutation einer Urform des M-Typs in Richtung auf den H-Typ hat den Besitzern des letzteren einen besseren aeroben Stoffwechsel der Muskulatur und damit den Vorteil größerer Ausdauer verliehen (155,172,173,197).

WIELAND und PFLEIDERER (192) haben die während der Embryonalentwicklung auftretenden Veränderungen des organspezifischen LDH-Musters untersucht und bei mehreren Organen einen charakteristischen Wechsel des Enzymmusters bis zur endgültigen adulten Form festgestellt. Andere Organe verhalten sich indifferent. Die embryonale LDH-Form der menschlichen Leber z.B. ist die H_4 , die adulte die M_4 . Bei manchen Säugern verhält es sich umgekehrt.

Bei malignen Tumoren wurde im Zusammenhang mit der Hypothese GREENSTEINS schon auf das unabhängig von der Matrixform auftretende Abweichen der LDH-Isoenzyme zugunsten der M_4 , M_3 -Formen berichtet. Andere Autoren sahen hauptsächlich bei gastro-intestinalen Tumoren ein Überwiegen besonders der mittleren Banden (12,124,128,200). MERTEN und SOHLBACH sind sogar der Meinung, je nach Auftreten bestimmter Isoenzymfraktionen im peripheren Blut nach Bestrahlung eines Gewebes Aussagen über dessen eigentümliche Stoffwechselsituation und dessen Strahlensensibilität machen zu können.

3. Der LDH-Zyklus

Der Entstehungsort der LDH ist die Zelle. Innerhalb der Zellkompartimente wird sie im Hyaloplasma - "C-Raum" - und im Zellkern - N-Raum angetroffen (36,57,94,148,150-53). Jegliche im peripheren Blut meßbare Enzymaktivität stammt aus dem gesamten Zellpool. Es gibt einen individuellen und kollektiven Normalbereich der peripher meßbaren LDH, der aus der sogenannten physiologischen Undichte der Zellen herrührt. Das Blutisoenzymmuster integriert alle Organkomponenten.

Jeder Enzymanstieg beruht auf einer Zellmembrandurchlässigkeitserhöhung und gibt nicht die auslösende Art der Schädigung zu erkennen. Die Membrandurchlässigkeitserhöhung ist uniforme Antwort der Zelle auf verschiedene Noxen, die gemeinsame pathomechanische Ursache wird in einer gestörten Zelloxidation gesehen (6).

Die Interpretation peripherer LDH-Aktivitäten sowie deren Isoenzymzusammensetzungen müssen das dynamische Verhalten der LDH innerhalb der Körperflüssigkeiten berücksichtigen, das durch Bildung des Enzyms, Abgabe an die Peripherie, Verteilung im extrazellulären Raum und Verlust der enzymatischen Wirksamkeit gekennzeichnet ist. Ein gegebener Enzymwert ist lediglich eine Photographie aus einem laufenden Film. Welche Rolle der Zeitfaktor spielt, beweisen die Halbwertszeiten der LDH-Isoenzyme. Sie differieren je nach Autor etwas, übereinstimmend nehmen sie jedoch von LDH_1 bis LDH_5 ab (13,23,145). SCHMIDT (145) gibt die HWZ der LDH_1 mit 113 h., die der LDH_5 mit 10 h. an. BÄR und OHLENDORF schrieben, daß die Enzyme in aktiver Form eliminiert würden (13). Eine Enzymausscheidung mit dem Urin, den Faeces oder der Galle konnte nicht festgestellt werden. Nach FLEISHER u.a. soll dem RES dabei eine besondere Funktion zukommen (43,175). Ob den von WACKER

u.a. im menschlichen Urin isolierten Peptidinhibitoren der LDH, einer inhiibiert spezifisch H_4 , der andere $M_4(141)$, dabei eine bestimmte Rolle zufällt, ist unklar. Schließlich sei noch erwähnt, daß nach Gewinnung einer Blutprobe die Höhe der gemessenen Enzymaktivität unter anderem in starkem Maße vom Zeitpunkt der Bestimmung, der Aufbewahrungstemperatur und davon, ob Vollblut oder Plasma verwendet wird, abhängt (27).

4. Die Beziehung der LDH und ihrer Isoenzyme zu einigen Tumoreigenschaften

WARBURGS Feststellung hoher anaerober und aerober Glykolyse, eingeschränkter Respiration, Erhöhung der Gesamt-LDH und der Milchsäure als allgemeines Tumorcharakteristikum ist von vielen Untersuchern teils bestätigt, teils abgelehnt worden (53, 55, 56, 57, 122, 125-27, 176-78a, 184-87). Manche Autoren haben im Unterschied zum Muttergewebe in der Isoenzymausstattung einen Wechsel zum Überwiegen der kathodischen M-Fraktion gesehen und stärken so die Konvergenzhypothese GREENSTEINS. Andere wiederum haben eine "erstaunliche Ähnlichkeit mit dem Muttergewebe" festgestellt.

Nach WACHSMUTH u.a. (172) beeinträchtigt eine hohe Pyruvat- und besonders Laktatkonzentration die Arbeitsfähigkeit des M-Enzyms im Gegensatz zum H-Enzym nicht, so daß hierdurch ein Überwiegen der M-Form in malignen Tumoren eine sinnvolle Erklärung finden würde. Auch dies kann nach VESELL nicht einhellig bejaht werden (169). BOXER und DEVLIN (22) und BOXER und SHONK (21) heben hervor, daß die Pyruvatreduktion der einzig gangbare Stoffwechselweg in Tumoren sei, ohne Beteiligung der Mitochondrien die bei der Triosesphosphatoxidation anfallende $NADH_2$ zu oxidieren und so die Arbeitsfähigkeit des glykolytischen Systems zu erhalten. Es hat nicht an Versuchen

gefehlt, Tumorgröße, Wachstumsgeschwindigkeit und histologischen Malignitätsgrad mit der Höhe der Gesamt-LDH-Aktivität zu korrelieren. Was im Einzelfall gelang, konnte jedoch nicht zur Allgemeingültigkeit erhoben werden. In diesem Zusammenhang sei besonders das Verhalten der "minimal deviation hepatomas" erwähnt (111a,125-27).

5. Biochemische Veränderungen unter der Anwendung ionisierender Strahlen

Allgemein kann man bei niedrigeren Röntgendosen eher eine Aktivierung der Glykolyse bei höheren eine Erniedrigung beobachten. OHYAMA u. Mitarbeiter fanden, daß bei Thymozyten nach Bestrahlung das Fructose - 1,6 - diphosphat ansteigt und nehmen an, daß unter den von ihnen gewählten Bedingungen das Phosphofructokinase-System aktiviert wird (zit.n.158), wahrscheinlich durch strahlenbedingte Veränderungen der Adenin-nucleotide. So steigern Mono- und Dinucleotid sowie anorganisches Phosphat die Phosphofructokinase-Aktivität, während das Adenosintriphosphat dieses Enzym hemmt. Nach einer Bestrahlung wird aber der ATP-Gehalt erniedrigt gefunden.

In anderen Versuchsansätzen erreichte die Laktatbildung nach Bestrahlung mit 8 kR ein Maximum und fiel nach Einwirkung höherer Strahlendosen ab (zit.n.158).

RATHGEN und Mitarbeiter beobachteten eine Hemmung der anaeroben Glykolyse bei Yoshida-Sarkomzellen, wenn sie mit 25 kR bestrahlt wurden (zit.n.158) bei Ansteigen des Gehaltes an Fructose-1,6-disphosphat.

FORSSBERG beobachtete ein Abnehmen des Gehaltes an Pyruvat und Laktat kurz nach Bestrahlung der Aszites-Zellen in vivo mit

1250 R. Wenige Stunden darauf hatte sich die glykolytische Aktivität wieder normalisiert (zit.n.158). Werden die Tumorzellen dagegen mit 55 kR bestrahlt, so fällt der Gehalt an Fructose-1,6-diphosphat ab, die strahlenbedingte Hemmung der Glykolyse ist dann irreversibel (158). Die Aktivität der glykolytischen Enzyme, die unter optimalen Bedingungen in vitro gemessen werden, ist nach einer Bestrahlung mit 25 kR nicht beeinträchtigt. Nach MAASS u.Mitarbeiter verlaufen, gemessen am Yoshida-Ascites-Sarkom, glykolytische Aktivität und Gehalt an NAD parallel zueinander (zit.n.158). Die Autoren nehmen dabei an, daß der Abfall der Glykolyse durch strahlenbedingten NAD-Verarmung erfolgt, da das NAD bei der Dehydrierung des Phosphoglycerinaldehyds nicht mehr ausreichend vorhanden ist.

DOSE u.Mitarbeiter nehmen an, daß mit steigender Strahlendosis zunehmender ATP-Verlust sowie vermehrtes Diffundieren von Kalium aus den Zellen bei der Glykolysehemmung beteiligt sind (zit.n.158).

Offensichtlich ist die aerobe Glykolyse gegenüber Strahlen resistenter als die anaerobe. Selbst nach 50 kR haben ECKSTEIN u.Mitarbeiter in teilungssynchronisierten Hefezellen keine Beeinträchtigung der aeroben Glykolyse gefunden (zit.n.158).

Es ist von verschiedenen Autoren diskutiert worden, ob strahlenbedingte Permeabilitätsveränderungen der strukturierten Stoffwechselbarrieren innerhalb der Zelle von wesentlicher Bedeutung für die biologische Strahlenwirkung sind, wie sie z.B. als Oxidation von SH-Gruppen und Bildung von Lipidperoxiden bekannt sind. Insbesondere von BAQ und ALEXANDER stammt die Hypothese, daß das "enzyme release" aus den verschiedenen biochemischen Kompartimenten die primäre biochemische Strahlenschädigung darstelle (14), Auf den Verlust von Ionen, ATP,

NAD wurde bereits hingewiesen, über den Verlust des Zellkernes an glykolytischen Enzymen u.a. der LDH berichten HAGEN und Mitarbeiter. Andererseits konnte von STREFFER und MELCKING (158) ein Verlust von Milzmitochondrien an Glutamatdehydrogenase zwar nachgewiesen werden, ein Ansteigen der Enzymaktivität im Cytoplasma wurde jedoch nicht beobachtet. Nach einer Bestrahlung des Menschen oder von Säugtieren sind mehrere Enzyme im Blutserum erhöht, darunter die LDH, GOT und GPT. Diese Erscheinung wird von STREFFER aber eher auf einen strahlenbedingten Abbau von Geweben, vergleichbar anderen pathologischen Zuständen, wie Herzinfarkt, Leberschäden, als auf Permeabilitätsänderungen zurückgeführt.

III. FRAGESTELLUNG

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, den jeweiligen Anteil der LDH-Isoenzyme an der Gesamt-LDH eines transplantablen Rattentumors in einer abgestuften Gewebeerstörung festzustellen, die analogen Serumverhältnisse zu beobachten und eine mögliche Änderung der untersuchten Parameter unter einer einzeitigen Strahlendosis zu erfassen.

Die Untersuchungen sollten zur Klärung der Frage beitragen, inwieweit die LDH und ihre Isoenzyme zur Tumordiagnostik zu verwerten sind und ob sich aus Veränderungen unter der Bestrahlung Rückschlüsse auf die Wirksamkeit der Behandlung ziehen lassen.

IV. MATERIAL UND METHODE

1. Versuchstiere und Tumor

Unsere Versuche wurden an männlichen Wistar-Ratten von durchschnittlich 250 g Körpergewicht durchgeführt. Sie wurden mit handelsüblichem Trockenfutter und Wasser ad libitum ernährt und waren unter konstanten Raumbedingungen in Kästen zu je fünf Ratten untergebracht.

Als Tumor verwendeten wir das Walker-Karzinom aus eigenen Passagen. Der Tumor wurde möglichst steril freipräpariert, von der bindegewebigen, teilweise recht dicken Kapsel und von evtl. Nekrosen befreit, mit einer Schere grob zerkleinert und dann durch eine Embryonenquetsche gedreht. Der so erhaltene Gewebepbrei wurde in einem Mörser unter Hinzufügung von Hanks-Lösung in einer Verdünnung von 1:5 zerrieben. Davon wurden jeder Ratte 1 ml unter eine abgehobene Hautfalte in der Nackengegend subfaszial gespritzt.

Alle Tiere wurden am 11. Tag nach Tumorimplantation in Äthernarkose durch Dekapitation getötet. Das Blut aufgefangen und zu den Serumenzymbestimmungen sowie den LDH-Isoenzymbestimmungen verwendet. Die Tumoren - etwa doppeltwalnußgroß - wurden in toto ausgeschält und gekühlt bis zur weiteren Aufarbeitung aufbewahrt. Die Ratten wurden in Gruppen zu je acht Tieren am 8., 9. und 10. Tag nach Tumorimplantation in Äthernarkose lokal unter Tiefentherapiebedingungen mit 200 KV 0,5 mm Cu-Filter, 1 cm HWS, 8 cm FHA einzeitig mit einer Dosis von 800 R bestrahlt. Jede Ratte wurde dabei so unter einen 4 cm-Rundtubus gebracht, daß nur der Tumor im direkten Strahlengang lag. Um eine möglichst homogene Durchstrahlung des Tumors zu gewährleisten, applizierten wir je 400 R von jeder freien Tumorseite. Die entsprechenden

Kontrollgruppen unbestrahlter Tiere wurden mitgeführt.

2. Gewebeaufbereitung

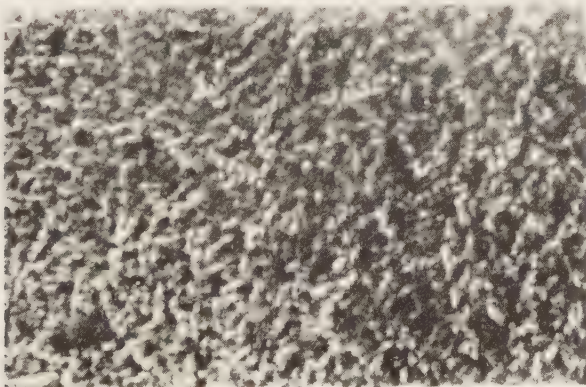
Von jedem der oben angeführten Tumortiere wurde 1 g Tumorgewebe ausgewählt, das makroskopisch eine grau-weißliche Farbe zeigte, von weicher, "medullärer" Beschaffenheit war und kein Blut erkennen ließ.

a) Totalhomogenat

Das Tumorgewebe von 1 g Frischgewicht wurde in ein Gefäß mit 10 ml Phosphatpuffer pH 7,4, 0,05 M gebracht und im Eisbad für 2x3 Min. mit kurzen Pausen mit dem Ultra-Turrax TP 18/2 homogenisiert. Am Ende jeder "Halbzeit" wurden Temperaturmessungen in der Mitte des Homogenats durchgeführt. Das Homogenat wurde dann bei 100 000 g in der WKF-Ultrazentrifuge bei 4°C zentrifugiert, der Überstand zur Enzymauswertung aufbewahrt und das Sediment verworfen.

Abb.1 Ausstrichpräparat des bei dem Totalhomogenat angefallenen Sediments.

Es zeigt sich eine aus zerstörten Gewebekomponenten bestehende gestaltlose Masse, durch Überlagerungseffekte der dicken Schicht werden an dunkleren Stellen Kerne vorgetäuscht.



b) Schrittweise Gewebsdisintegration

In Anlehnung und Modifikation der Methode von DELBRÜCK u.a. (36) wurde das Tumorgewebe im ersten Gang mit 10 ml Phosphatpuffer 0,125 M, pH 7,4 versetzt und unter 10-maligem Auf- und Ab im Zellhomogenisator der Firma Colora aufgeschlossen. Das erhaltene Homogenat wurde bei 4°C mit 100 000 g sedimentiert, der Überstand (Ü I) zur Enzymbestimmung aufbewahrt und das Sediment dem zweiten Gang zugeführt. Dabei erfolgte eine Versetzung des Sediments mit 10 ml Phosphatpuffer 0,05 M, pH 7,4, das nach 5-maligem Auf- und Ab des Stempels beim Homogenisieren wie oben beschrieben zentrifugiert wurde. Dadurch erhielten wir Ü II. Der dritte Schritt war eine Wiederholung des zweiten (Ü III). Im vierten Schritt ließen wir in Abänderung des dritten den Stempel des Homogenisators 30 mal auf und abgehen und unterwarfen dieses Homogenat anschließend noch einer 3-minütigen Ultra-Turrax-Homogenisation. Das weitere Vorgehen erfolgte wie zuvor (Ü IV), das Sediment wurde verworfen.

c) Gewinnung einer Kernfraktion

Die prinzipielle Frage, ob eine Kernisolierung im nicht-wässrigen oder im wässrigen Medium den "wahren Kernstatus" besser wiedergibt, findet Befürworter der einen aber auch der anderen Methoden (5,39,110,152,153).

Zur Prüfung der Kernreinheit werden neben histologischen Kontrollen Bestimmungen cytoplasmatischer, mitochondrialer und ribosomaler Enzyme empfohlen, deren Vorhandensein eine Verunreinigung mit dem betreffenden Enzymträger anzeigen soll (110,152,153). Von der Überlegung ausgehend, daß das Kernvolumen in der Größenordnung von 10% des Zellvolumens (91) und die Menge der Kern-LDH im Bereich der des Cytoplasmas liegt, glaubten wir selbst dann noch einen evtl. bestehenden Unterschied in der Isoenzymausstattung Cytoplasma/Kern feststellen zu können, wenn es gelingt, möglichst viel Cytoplasma genügend schnell zu entfernen, um

eine Neuverteilung der Enzyme beim Arbeiten im wässrigen Medium einzudämmen. Ein nach dem Entropiegesetz notwendiger Energiebedarf zur Aufrechterhaltung einer Isoenzymdifferenz könnte jedenfalls durch kerneigene Energieproduktion gedeckt werden. Stellen andererseits die Kernporen freie Zugangswege von und zum Kern dar, ist mit einer Differenz nicht zu rechnen.

Eine Isolierungsmethode unter Zuhilfenahme von Triton X-100 schien uns wegen der hierbei ausreichenden Kernaussbeute geeignet.

Abb. 2 Übersichtsbild über ein "Rohsediment".
Kernsediment nach Behandlung mit Triton X-100 und TSS-Puffer. Es lassen sich massenhaft Zellkerne mit teilweise zipfelig ausgezogenen Zytoplasmasäumen und vereinzelt deutlich dunkleren Nucleoli erkennen.

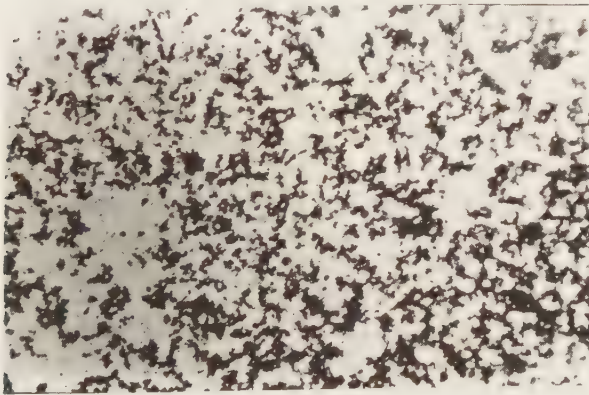
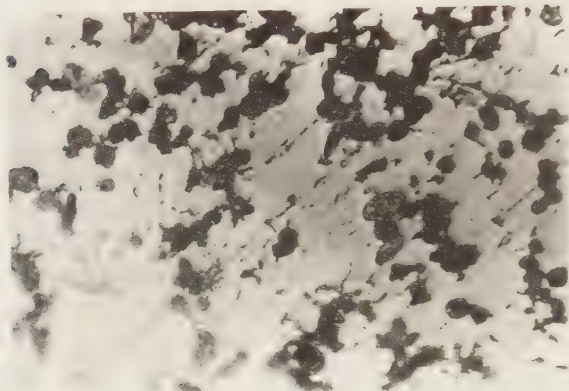
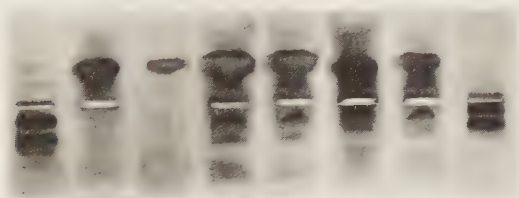


Abb.3 Beliebige Ausschnittsvergrößerung der Abb.2
Deutlich erkennbare Kerne mit dunkleren Nucleoli. Die Kerne
zum Teil sehr dicht beieinander und lassen sich gegenseitig
nicht abgrenzen. Die meisten haben sich überlappende Zyto-
plasmasäume, dazwischen Zelldetritus.



In Vorversuchen hatten weder Triton in einer benötigten
Endkonzentration von 2%, der benutzte TSS-Puffer noch beide
zusammen nach Mischung mit Plasma eine LDH-Aktivitätsein-
buße gezeigt. Bei der elektrophoretischen Auftrennung der
mit Triton inkubierten LDH zeigte sich jedoch, daß das
Triton eine starke Verzerrung der Isoenzymbanden bewirkte
und selbst als Fleck - wie ein alleiniges Wandernlassen des
Tritons erwies - zur Anode in den Bereich zwischen Fraktion
I und II wanderte. Eine Auswertung war deshalb nicht möglich

Abb. 4 An den Außenseiten jeweils eine Elektrophorese normalen menschlichen Serums. Auf jedem Objektträger sind die 5 Isoenzyme deutlich erkennbar. Im Bild oben die schwach ausgeprägten anodischen (H) - Fraktionen, unten die stark hervortretenden kathodischen (M). Hinter den M-Banden ist ein, wahrscheinlich auf mitgewanderte Serumproteine oder Lipoproteide zurückzuführender Schleier sichtbar. Neben der linksseitigen "normalen" Elektrophorese befindet sich die Abbildungen einer 20 bzw. 5%igen gewanderten Triton X-100 Lösung. Die folgenden Objektträger zeigen Elektrophoresen, bei denen Serum und Triton in unterschiedlicher Endkonzentration (2-10%) gemischt wurden. Es stellt sich deutlich der anodische Tritonfleck, der die Fraktionen I und II sprengt, dar. Die tritongemischten Elektrophoresen weisen weiterhin Verzerrungen der Isoenzymbanden und im Vergleich zu den reinen Seren unsaubere Trennung auf.



Die Kernisolierung, die wir daraufhin nach einem Vorschlag von BEHEIM und JANN (16) durchführten, erbrachte bei ungleich längerem Zeitaufwand keineswegs bessere Ergebnisse. Der letzte Schritt der Gewinnung war, die Rohkerne durch Zentrifugation in 2,4 M Saccharoselösung bei 40 000 g für 30 min. zu reinigen. Die Schwierigkeit bestand nun darin,

die sedimentierten Kerne aus dieser sirupartigen Saccharose-
lösung quantitativ zu gewinnen, was nicht möglich war.

Abb. 5 Übersicht über ein nach der Methode von BEHEIN und JANN ge-
wonnenes Kernsediment. Objektträgersausstrich des bei 100000g
in 2,4 M Saccharoselösung angefallenen Sediments.

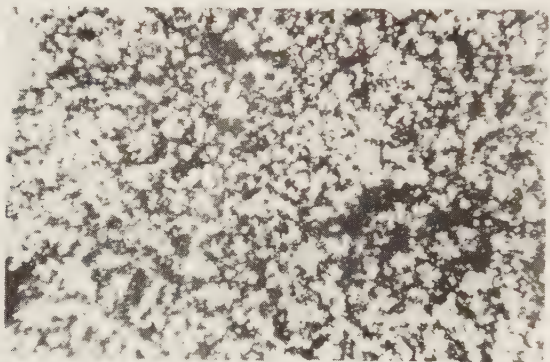


Abb.6 Ausschnittsvergrößerung der Abb. 4. Kerne mit Nucleoli deutlich erkennbar. Die dichter zusammenliegenden weisen stärkere Zytoplasmahöfe, die zum Teil zipfelig ausgezogen sind, auf.

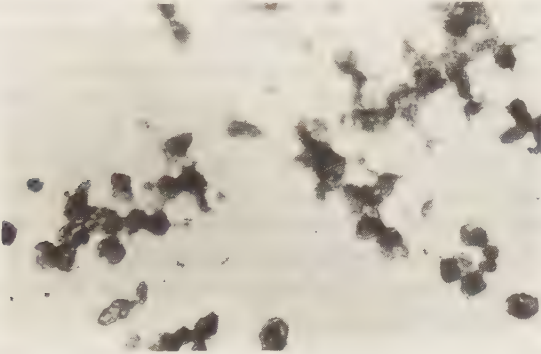


Abb.7 Im Auflicht photographierter Ausstrich des nach BEHEIM und JANN gewonnenen Kernsediments. Die runden mit einem Lichtreflex erscheinenden Gebilde entsprechen dabei Zellkernen, der graue Hintergrund rührt von Verunreinigungen durch die 2,4 M Saccharoselösung mit darin enthaltenem amorphen Zelldetritus her.



Zudem schlug der Versuch fehl, in den jeweiligen Saccharose-überständen nach einer modifizierten Methode von CERIOTTI (31) und KECK (87) die DNS zu messen, da die hohe Saccharosekonzentration, auf die die Autoren schon hingewiesen hatten, keinen linearen Meßbereich ergab. So begnügten wir uns damit, die gewonnenen Kerne mit physiologischer Na Cl-Lösung zu reinigen, sie über Nacht in ca. 2 ml 0,05 M Phosphatpuffer im Kühlschrank aufzubewahren und den bei 100 000 g gewonnenen Überstand zur Agargelelektrophorese zu verwenden. In Kenntnis dessen, daß dabei nur ein der größten Orientierung dienendes Verfahren zur Anwendung kam und daß letztendlich eine Kontamination mit in der Saccharoselösung trotz Waschung enthaltener zytoplasmatischer LDH nicht ausgeschlossen werden konnte, möchten wir gleich vorwegnehmen, daß sich keine unterschiedliche Isoenzymkonstellation zeigte.

3. Vorbereitung zur Enzymbestimmung

Von allen Überständen, sowohl denen des Totalhomogenats, des schrittweisen Zellaufschlusses als auch der bei 3 000 g abzentrifugierten Seren, wurden nach entsprechender Verdünnung 0,1 ml in die vorgeschriebene Menge der LDH, GPT und GOT UV-Testreagenzien der Firma Boehringer/Mannheim gegeben und die Extinktionen bei den zugehörigen Wellenlängen im Eppendorf-Photometer gemessen. Die delta-E-Werte multipliziert mit dem Extinktions- und dem Verdünnungsfaktor ergab die Aktivitätseinheit mE/ml.

4. Vorbereitungen zur Isoenzymbestimmung

Die Isoenzymbestimmung erfolgte unter Verwendung der Elektrophoresegeräte der Firma Boskamp. Als Agar wurde der Difco Spezial Agar Noble verwendet. 1 g trockene Agarflocken wurden in 100 ml Pufferlösung folgender Zusammensetzung erhitzt, bis sie eine durchsichtige, homogene Flüssigkeit darstellte.

Puffer:

4,46 g Veronal-Na

2,94 g Na-Acetat

Aqua bidest. ad 1000

2 ml des flüssigen Agar-Gels wurden auf einen Objektträger geschichtet und abkühlen lassen. In eine ausgestanzte Rinne von 10x1 mm gaben wir dann mit einer Pipette die zu untersuchende Flüssigkeit. Die Isoenzymauftrennung erfolgte in der "Mikrophorkammer", die in einem genormten Rahmen acht Objektträger zur Elektrophorese aufnehmen kann, bei 220 V und 32 mA, für deren Konstanz der "Pherostat" sorgt. Die Konvektionskühlung durch den "Frigorphor" gewährleistete eine anhaltende Temperatur von 4°C.

Die Pufferlösung zur Elektrophorese bestand aus:

51,5 g Veronal-Na

9,2 g Veronal und

Aqua bidest. ad 2000,

mit der die Kammer bis zu einer bestimmten Marke zu füllen war.

Nach zwei Stunden Laufzeit wurden die Objektträger in eine Küvette gestellt mit 100 ml der Färbelösungen I und II versehen und für 1 1/2 Std. in einem Wasserbad von 37°C inkubiert.

Färbelösung I:

14,2 g Lithiumlaktat
1,0 g Natriumcyanid
37,38 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$
5,44 g KH_2PO_4
0,5 g Nitroblau-Tetrazolium
Aqua bidest ad 1000 ml

Färbelösung II:

Pro 100 ml Färbelösung I
112 mg NAD (Fa.Boehringer)
3 mg Phenazin
gelöst in 3 ml aqua bidest

Nach VAN DER HELM erfolgt die Färbung durch enzymatischen Umsatz des in der Färbelösung I im Überschuß vorhandenen Lithiumlaktats in Pyruvat. Der Wasserstoff, der bei der dabei eintretenden Oxidation des NAD zu NADH_2 anfällt, wird über eine Reihe von Zwischenträgern auf ein oxidiertes Tetrazolium übertragen, dessen Reduktion dann zum Ausfällen eines wasserlöslichen blauen Salzes an den Stellen der aufgetrennten Isoenzymbanden führt.

Dem Färben schließt sich das Fixieren an:

Die Objektträger werden für ca. 30 Min. in ein Bad, bestehend aus 70 ml Äthanol (100%), 25 ml bidest, 5 ml Eisessig gelegt, und anschließend über Nacht zwischen wasserfeuchtem Fließpapier getrocknet. Die fertigen Objektträger lassen das Agargel im Idealfall nur noch als sehr fein gelbstichigen, durchsichtigen Film erkennen, der die Isoenzymbanden je nach Enzymkonzentration deutlich dunkel- bis hellblau-violett hervortreten läßt.

5. Auswertung der Isoenzyme

Zur Auswertung der Isoenzymbanden wurde ein Extinktions- und ein damit gekoppelter Integralschreiber der Firma Carl Zeiss mit dem Lichtfilter FE 60 benutzt.

Unter der Voraussetzung der Proportionalität zwischen Enzymmenge und Grad der Anfärbbarkeit, sowie zwischen dieser und der gemessenen Extinktion, ist die von der Basislinie und den Isoenzymextinktionskurven eingeschlossene Fläche ein Maß für die Enzymmenge. Die Extinktionskurven wurden als Integralkurve aufgezeichnet, die korrespondierenden Punkte eingetragen und nach Einzeichnen von Hilfslinien die Isoenzymanteile mittels eines Auswertungsrahmens in Relativprozenten abgelesen. Sofern eine Aufzeichnung mit dem Integralschreiber wegen besonders intensiv angefärbten Fraktionen nicht möglich war (das Maximum der Auswertbarkeit liegt bei etwa 100 mE/ml pro Fraktion) ermittelten wir die prozentualen Anteile mit dem Kompensationsplanimeter der Firma A. Ott. Dieses Verfahren stellt eine semiquantitative Methode dar. Aber auch die Angabe in Relativprozenten ist mit verschiedenen Fehlermöglichkeiten belastet, die nicht immer zu berücksichtigen sind und deshalb den zahlenmäßigen Vergleich schwierig gestalten. Einige wenige Imponderabilien seien kurz angedeutet: Der eingetrocknete Agarfilm absorbiert - nur im Idealfall über den gesamten Objektträger gleichmäßig - in unspezifischer Weise Licht, und nur das Stanzloch ist völlig lichtdurchlässig. Vor der Fraktion V und ohne Absatz in diese übergehend, erscheint regelmäßig ein weiß-gelblicher Schleier, vermutlich von mitgewanderten Proteinen herrührend, der entweder die Bezugslinie zu weit anhebt, so daß schwächer ausgeprägte Isoenzymfraktionen ihr gegenüber negativ werden, oder, wenn man von der anderen Seite beginnt, die Fraktion V immer zu hoch gemessen wird. Daß der Extinktionsschreiber beim Überfahren der Stanzrinne nicht aufsetzen darf, weil der Integralschreiber dies als Steigung und mithin als zu großen Anteil der angrenzenden Fraktionen II und III aufzeichnet, sei noch am Rande erwähnt.

Alle Elektrophoresen, angefangen mit denen der Tumorseren über die der Gesamthomogenate und der Fraktionen I - IV bis zu den "Kernfraktionen" und denen der 2,4 M Saccharose-überstände zeigten mit Ausnahme schwacher nicht auswertbarer anderer Banden nur das M_4 -Isoenzym. Der Unterschied zu den Seren nichttumortragender Tiere war deutlich.

Abb.8 Links im Bild eine Normalserum-Elektrophorese, daneben Seren von Tumortieren am 11.Tag nach Tumorimplantation. Die teilweise ausschließliche Representation des M_4 -Isoenzyms ist deutlich.

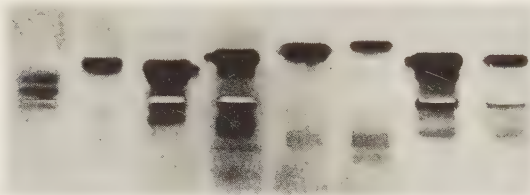


Abb.9 Totalhomogenat-Elektrophoresen. Selbst bei nur geringer Verdünnung des Überstandes stellt sich fast ausschließlich die M_4 -Fraktion dar.

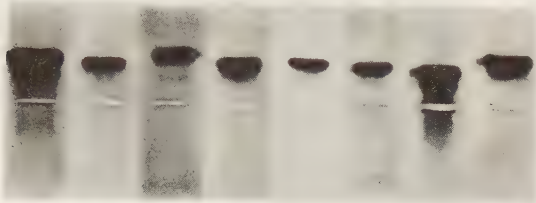


Abb.10 Elektrophoresen der Überstände des. 1.Schrittes der Gewebearbeitung. Ausschließlich die M_4 -Fraktion hat sich dargestellt.

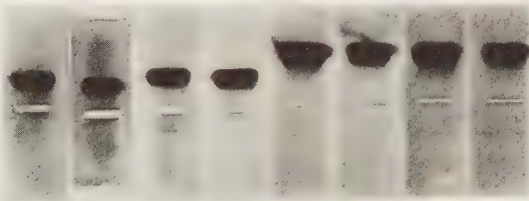


Abb.11 Elektrophoresen der Überstände des 2., 5. und 4. Aufbereitungsschrittes. Nur die M_4 -Fraktion hat sich dargestellt.

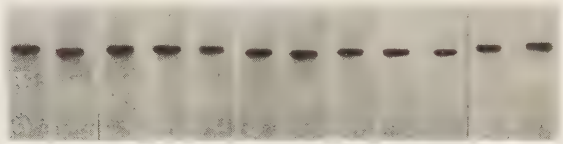


Abb.12 Elektrophoresen der Phosphatpufferüberstände der "Kernfraktion". Es zeigen sich lediglich die M_4 -Banden.

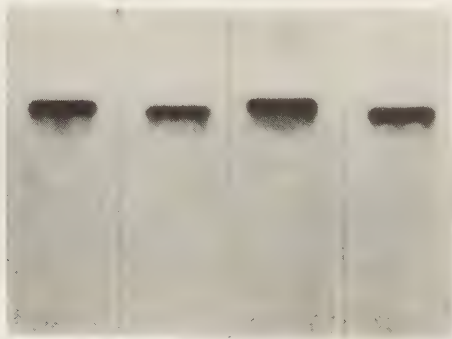
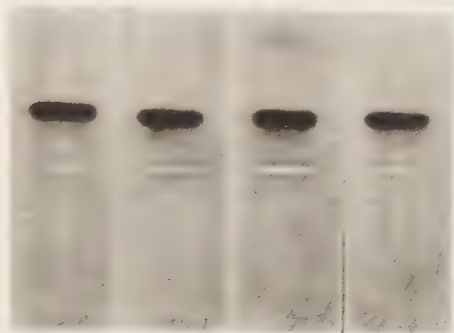


Abb.13 Elektrophoresen der 2,4 M Saccharoselösung-Überstände der Kernfraktionen. Sie zeigen ausschließlich die M_4 -Banden.



1. Enzymkonzentrationen im Tumorgewebe am 14. Tag nach der Tumorzellimplantation

n	Gesamthomogenat			Fraktion I			Fraktion II			Fraktion III			Fraktion IV		
	LDH	GOT	GPT	LDH	GOT	GPT	LDH	GOT	GPT	LDH	GOT	GPT	LDH	GOT	GPT
1	29589	1100	3100	12313	540	120	4486	100	40	4104	110	60	2519	170	250
2	24817	2200	2600	12694	660	210	3579	150	70	3913	180	85	1177	115	430
3	23862	1800	2500	12408	240	100	5151	200	85	3054	200	75	4963	185	260
4	30544	4500	1900	12026	320	140	9545	200	90	3531	120	90	3760	190	210
5	19090	2200	2000	12599	540	120	6299	180	80	3818	160	80	1756	100	540
6	20044	2200	2100	12599	280	135	2481	110	50	3340	140	45	1832	190	340
7	21953	1600	2300	13172	480	175	6872	130	80	2863	165	70	6566	50	700
8	23862	3700	2500	13744	500	170	5917	190	110	3818	170	120	3359	540	610

V. ERGEBNISSE

2. Enzymkonzentrationen im Tumorgewebe am 11.Tag nach der Tumorzellimplantation
und Bestrahlung am 8.Tag

n	Gesamthomogenat			Fraktion I			Fraktion II			Fraktion III			Fraktion IV		
	LDH	GOT	GPT	LDH	GOT	GPT	LDH	GOT	GPT	LDH	GOT	GPT	LDH	GOT	GPT
1	19090	2140	1980	16537	960	240	1613	120	90	1710	90	74	143	140	160
2	18880	1130	1760	10641	640	320	1364	90	76	1710	67	62	209	117	210
3	20378	1670	1230	10384	370	160	1744	70	43	2000	104	100	209	86	130
4	15987	2200	870	12217	740	190	1992	40	32	1430	83	48	171	104	207
5	16990	995	2100	12523	250	200	1116	26	110	2570	21	35	161	67	61
6	17637	1215	1790	10079	320	130	1970	97	80	2860	74	71	162	109	86
7	18994	1400	1470	11160	480	190	1240	145	95	2000	106	100	200	195	170
8	18355	1990	2310	12614	680	160	1420	160	120	1710	77	65	171	204	137

3. Enzymkonzentrationen im Tumorgewebe am 11.Tag nach der Tumorzellimplantation
und Bestrahlung am 9.Tag

n	Gesamthomogenat			Fraktion I			Fraktion II			Fraktion III			Fraktion IV		
	LDH	GOT	GPT	LDH	GOT	GPT	LDH	GOT	GPT	LDH	GOT	GPT	LDH	GOT	GPT
1	16274	1360	1460	11692	270	160	2853	130	106	1069	138	96	660	270	390
2	15596	1540	1630	12885	361	134	1737	96	47	400	174	88	715	314	280
3	17457	1270	691	13248	596	190	1116	410	131	267	318	104	334	116	148
4	16886	680	985	2577	730	210	1240	73	63	267	100	63	1002	510	169
5	16388	1073	1216	8590	1009	370	3035	190	91	364	97	164	241	190	317
6	16195	1119	2004	17066	613	125	1613	213	137	400	206	117	307	116	490
7	15720	993	796	14322	270	190	1364	160	69	734	134	108	415	123	179
8	19396	1416	1390	15187	315	270	1737	411	116	686	211	99	715	135	183

4. Enzymkonzentrationen im Tumorgewebe am 11.Tag nach der Tumorzellimplantation
und Bestrahlung am 10.Tag

n	Gesamthomogenat			Fraktion I			Fraktion II			Fraktion III			Fraktion IV		
	LDH	GOT	GPT	LDH	GOT	GPT	LDH	GOT	GPT	LDH	GOT	GPT	LDH	GOT	GPT
1	17639	1490	2010	16035	793	211	2481	163	104	158	192	96	286	270	240
2	15119	1180	1140	15272	645	319	1861	214	96	610	99	99	305	340	350
3	19214	1560	990	14355	931	171	1985	168	84	706	114	104	400	130	120
4	12914	1730	1370	14355	443	200	2223	135	62	954	132	83	410	99	130
5	19385	1290	1190	16188	1147	316	2109	143	106	839	210	102	410	190	130
6	18307	1410	1270	16799	397	149	2729	89	71	1183	77	69	439	250	80
7	19214	1670	1340	17505	516	231	2605	217	99	1374	150	83	553	210	190
8	18899	1550	1150	14035	269	119	1985	88	100	1183	110	103	410	160	280

5. Enzymkonzentrationen im Serum

Tumortiere am 11.Tag nach der Tumorzellimplantation

n	Kontrolltiere			unbestrahlt			am 8.Tag bestrahlt			am 9.Tag bestrahlt			am 10.Tag bestrahlt		
	LDH	GOT	GPT	LDH	GOT	GPT	LDH	GOT	GPT	LDH	GOT	GPT	LDH	GOT	GPT
1	132	25	10	290	35	14	250	23	21	713	41	14	317	20	7
2	112	23	17	163	112	28	640	19	27	195	18	25	269	22	22
3	110	31	7	417	18	31	316	53	40	267	19	23	195	18	18
4	179	19	9	650	16	22	194	24	12	411	29	35	412	45	33
5	183	20	10	183	37	18	286	34	19	319	37	14	461	75	12
6	137	22	19	453	47	11	511	118	8	175	23	19	219	23	16
7	120	21	12	220	35	33	167	39	42	316	43	34	367	16	8
8	199	16	6	340	43	51	390	24	12	248	51	28	715	42	39
9	148	27	19												
10	179	17	8												

VI. AUSWERTUNG

Zunächst wurden die Mittelwerte und Streuungen der Enzyme im Tumorgesamthomogenat und in den einzelnen Enzymfraktionen unter den verschiedenen Behandlungsbedingungen ermittelt, die in den folgenden Tabellen wiedergegeben sind:

1. Enzymkonzentrationen im Gesamthomogenat und in den Tumorfractionen am 11.Tag nach der Tumorzellimplantation

	LDH	GOT	GPT
Gesamt- homogenat	24 220 4 112 8	2 412 1 128 8	2 375 388 8
Fraktion I	12 694 547 8	445 148 8	146 36 8
Fraktion II	5 541 2 171 8	157 41 8	76 22 8
Fraktion III	3 551 438 8	156 78 8	78 22 8
Fraktion IV	3 241 1 823 8	280 235 8	417 183 8

2. Enzymkonzentrationen im Gesamthomogenat und in den Tumorfraktionen am 11.Tag nach der Tumorzellimplantation und 1.Tag nach der Bestrahlung

	LDH	GOT	GPT
Gesamt-homogenat	17 586 2 354 8	1 485 185 8	1 307 308 8
Fraktion I	15 568 1 267 8	643 296 8	214 73 8
Fraktion II	2 274 321 8	152 49 8	90 16 8
Fraktion III	876 389 8	135 46 8	92 13 8
Fraktion IV	402 82 8	206 79 8	190 95 8

3. Enzymkonzentrationen im Gesamthomogenat und in den Tumorfraktionen am 11.Tag nach der Tumorzellimplantation und 2.Tag nach der Bestrahlung

	LDH	GOT	GPT
Gesamt-homogenat	16 739 1 229 8	1 181 274 8	1 271 441 8
Fraktion I	11 945 4 538 8	5 205 265 8	206 80 8
Fraktion II	1 837 721 8	210 132 8	95 35 8
Fraktion III	523 282 8	172 73 8	105 29 8
Fraktion IV	549 265 8	222 139 8	269 123 8

4. Enzymkonzentrationen im Gesamthomogenat und in den Tumorfraktionen am 11.Tag nach der Tumorzellimplantation und 3.Tag nach der Bestrahlung

	LDH	GOT	GPT
Gesamt-homogenat	18 288 1 389 8	1 592 475 8	1 688 475 8
Fraktion I	12 019 2 077 8	555 242 8	199 59 8
Fraktion II	1 557 327 8	93 47 8	81 30 8
Fraktion III	2 001 484 8	78 27 8	69 23 8
Fraktion IV	178 25 8	128 49 8	145 53 8

5. Enzymkonzentrationen im Serum von Tieren ohne Tumor
und Tumortieren am 11.Tag nach der Tumorzellimplantation

	LDH	GOT	GPT
Tiere ohne Tumor	150	22	12
	33	5	5
	10	10	10
Tumortiere	357	43	26
unbestrahlt	158	30	13
	8	8	8
Tumortiere	369	33	19
1.Tag nach	167	20	11
Bestrahlung	8	8	8
Tumortiere	330	33	24
2.Tag nach	171	12	8
Bestrahlung	8	8	8
Tumortiere	344	42	23
3.Tag nach	162	33	13
Bestrahlung	8	8	8

Um diese Ergebnisse statistisch abzusichern und letztlich erst dadurch eine Interpretation zu ermöglichen, wurde der t-Test durchgeführt. Die Hypothesenprüfung lag in der Fragestellung: Ist die Zunahme bzw. Abnahme des jeweiligen Meßwertes bestrahlter Tiere gegenüber den äquivalenten Ausgangswerten und den Werten unter den verschiedenen Behandlungsbedingungen signifikant? Als Grenzniveau wurde die 95%-Vertrauensgrenze gewählt.

Die Ergebnisse sind in den folgenden Signifikanzschemata wiedergegeben:

1a. Tumorgesamthomogenat, LDH-Konzentration

	1.Tag nach Bestrahlung	2.Tag nach Bestrahlung	3.Tag nach Bestrahlung
ohne Bestrahlung	3,70=sig.	4,61=sig.	3,62=sig
1.Tag nach Bestrahlung		0,84=n.sig.	0,68=n.sig.
2.Tag nach Bestrahlung			2,21=sig.

1b. Tumorgesamthomogenat, GOT-Konzentration

	1.Tag nach Bestrahlung	2.Tag nach Bestrahlung	3.Tag nach Bestrahlung
ohne Bestrahlung	2,15=sig.	2,81=sig.	3,39=sig.
1.Tag nach Bestrahlung		2,43=sig.	0,56=n.sig.
2.Tag nach Bestrahlung			1,98=?sig.

1c. Tumorgesamthomogenat, GPT-Konzentration

	1.Tag nach Bestrahlung	2.Tag nach Bestrahlung	3.Tag nach Bestrahlung
ohne Bestrahlung	5,70=sig.	4,97=sig.	2,96=sig.
1.Tag nach Bestrahlung		0,18=n.sig.	1,78=?sig.
2.Tag nach Bestrahlung			1,70=?sig.

2a. Tumorfraktion I, LDH-Konzentration

	1.Tag nach Bestrahlung	2.Tag nach Bestrahlung	3.Tag nach Bestrahlung
ohne Bestrahlung	5,51=sig.	0,43=n.sig.	0,83=n.sig.
1.Tag nach Bestrahlung		2,03=?sig.	3,83=sig.
2.Tag nach Bestrahlung			0,04=n.sig.

2b. Tumorfraktion I, GOT-Konzentration

	1.Tag nach Bestrahlung	2.Tag nach Bestrahlung	3.Tag nach Bestrahlung
ohne Bestrahlung	1,58=n.sig.	0,66=n.sig.	1,03=n.sig.
1.Tag nach Bestrahlung		0,81=n.sig.	0,6=n.sig.
2.Tag nach Bestrahlung			0,25=n.sig.

2c. Tumorfraktion I, GOT-Konzentration

	1.Tag nach Bestrahlung	2.Tag nach Bestrahlung	3.Tag nach Bestrahlung
ohne Bestrahlung	1,75=?sig.	2,36=sig.	1,13=n.sig.
1.Tag nach Bestrahlung		1,05=n.sig.	1,17=n.sig.
2.Tag nach Bestrahlung			2,20=sig.

3a. Tumorfraktion II, LDH-Konzentration

	1.Tag nach Bestrahlung	2.Tag nach Bestrahlung	3.Tag nach Bestrahlung
ohne Bestrahlung	3,94=sig.	4,28=sig.	6,42=sig.
1.Tag nach Bestrahlung		1,46=n.sig.	2,89=sig.
2.Tag nach Bestrahlung			0,24=n.sig.

3b. Tumorfraktion II, GOT-Konzentration

	1.Tag nach Bestrahlung	2.Tag nach Bestrahlung	3.Tag nach Bestrahlung
ohne Bestrahlung	1,22=n.sig.	0,11=n.sig.	3,68=sig.
1.Tag nach Bestrahlung		1,34=n.sig.	3,15=sig.
2.Tag nach Bestrahlung			2,36=sig.

3c. Tumorfraktion II, GPF-Konzentration

	1.Tag nach Bestrahlung	2.Tag nach Bestrahlung	3.Tag nach Bestrahlung
ohne Bestrahlung	2,15=sig.	2,57=sig.	0,10=n.sig.
1.Tag nach Bestrahlung		0,08=n.sig.	2,00=sig.
2.Tag nach Bestrahlung			2,50=sig.

4a. Tumorfraktion III, LDH-Konzentration

	1.Tag nach Bestrahlung	2.Tag nach Bestrahlung	3.Tag nach Bestrahlung
ohne Bestrahlung	5,87=sig.	5,53=sig.	5,22=sig.
1.Tag nach Bestrahlung		2,45=sig.	4,99=sig.
2.Tag nach Bestrahlung			9,86=sig.

4b. Tumorfraktion III, GOT-Konzentration

	1.Tag nach Bestrahlung	2.Tag nach Bestrahlung	3.Tag nach Bestrahlung
ohne Bestrahlung	1,18=n.sig.	0,07=n.sig.	3,53=sig.
1.Tag nach Bestrahlung		1,32=n.sig.	3,13=sig.
2.Tag nach Bestrahlung			3,77=sig.

4c. Tumorfraktion III, GOT-Konzentration

	1.Tag nach Bestrahlung	2.Tag nach Bestrahlung	3.Tag nach Bestrahlung
ohne Bestrahlung	2,08=sig.	2,34=sig.	0,22=n.sig.
1.Tag nach Bestrahlung		1,02=n.sig.	2,04=sig.
2.Tag nach Bestrahlung			2,36=sig.

5a. Tumorfraktion IV, LDH-Konzentration

	1.Tag nach Bestrahlung	2.Tag nach Bestrahlung	3.Tag nach Bestrahlung
ohne Bestrahlung	7,16=sig.	9,53=sig.	7,71=sig.
1.Tag nach Bestrahlung		1,29=n.sig.	6,91=sig.
2.Tag nach Bestrahlung			3,53=sig.

5b. Tumorfraktion IV, GOT-Konzentration

	1.Tag nach Bestrahlung	2.Tag nach Bestrahlung	3.Tag nach Bestrahlung
ohne Bestrahlung	0,17=n.sig.	0,09=n.sig.	1,59=n.sig.
1.Tag nach Bestrahlung		0,11=n.sig.	3,22=sig.
2.Tag nach Bestrahlung			1,69=?sig.

5c. Tumorfraction IV, GPT-Konzentration

	1.Tag nach Bestrahlung	2.Tag nach Bestrahlung	3.Tag nach Bestrahlung
ohne Bestrahlung	3,80=sig.	2,96=sig.	6,64=sig.
1.Tag nach Bestrahlung		1,06=n.sig.	1,16=n.sig.
2.Tag nach Bestrahlung			1,20=n.sig.

6a. Serum, LDH-Konzentration

Tumortiere, unbestrahlt	Tumortiere, 1.Tag nach Bestrahlung	Tumortiere, 2.Tag nach Bestrahlung	Tumortiere, 3.Tag nach Bestrahlung
Tiere ohne Tumor	30,9=sig.	3,42=sig.	3,12=sig.
Tumortiere, unbestrahlt	0,37=n.sig.	0,08=n.sig.	0,08=n.sig.
Tumortiere, 1.Tag nach Bestrahlung		0,45=n.sig.	0,28=n.sig.
Tumortiere, 2.Tag nach Bestrahlung			0,16=n.sig.

6b. Serum, GOT-Konzentration

Tumortiere, unbestrahlt	Tumortiere, 1.Tag nach Bestrahlung	Tumortiere, 2.Tag nach Bestrahlung	Tumortiere, 3.Tag nach Bestrahlung
Tiere ohne Tumor	2,04=?sig.	1,49=n.sig.	2,36=sig.
Tumortiere, unbestrahlt	0,73=n.sig.	0,82=n.sig.	1,77=?sig.
Tumortiere, 1.Tag nach Bestrahlung		0,00=n.sig.	0,06=n.sig.
Tumortiere, 2.Tag nach Bestrahlung			0,62=n.sig.
			0,68=n.sig.

6c. Serum, GPT-Konzentration

Tumortiere, unbestrahlt	Tumortiere, 1.Tag nach Bestrahlung	Tumortiere, 2.Tag nach Bestrahlung	Tumortiere, 3.Tag nach Bestrahlung
Tiere ohne Tumor	2,95=sig.	1,69=n.sig.	2,32=sig.
Tumortiere, unbestrahlt	1,09=n.sig.	0,35=n.sig.	0,43=n.sig.
Tumortiere, 1.Tag nach Bestrahlung		0,97=n.sig.	0,60=n.sig.
Tumortiere, 2.Tag nach Bestrahlung			0,17=n.sig.

Zur graphischen Darstellung wurden alle nicht signifikanten Werte untereinander verglichen und gemittelt, zur Verdeutlichung knapp unter- oder oberhalb des 95% Grenzniveaus liegender Signifikanzen wurde an der entsprechenden Stelle der schematischen Kurve ein Fragezeichen gesetzt. Diese schematischen Kurven erleichterten die Interpretation und gestatten qualitative und möglicherweise auch quantitative Schlüsse.

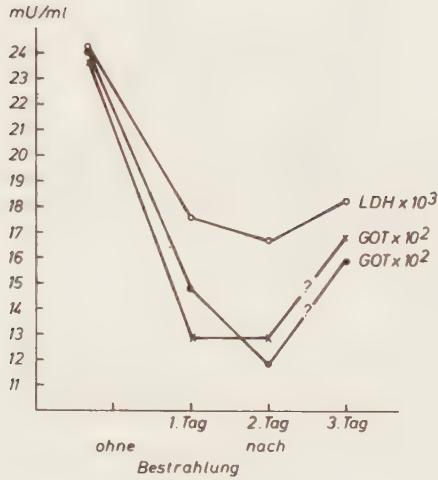


Abb. 14 Enzymkonzentrationen im Tumorgesamthomogenat am 11.Tag nach der Tumorzellimplantation

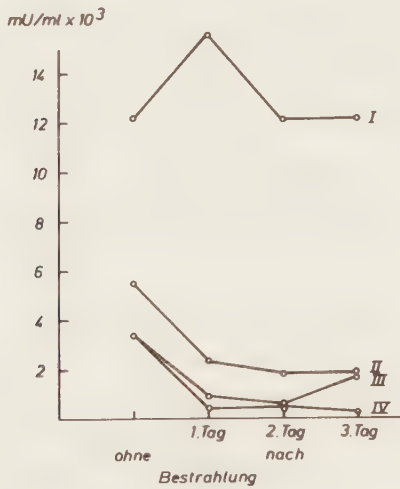


Abb. 15 LDH-Konzentrationen in den Tumorfraktionen am 11.Tag nach der Tumorzellimplantation

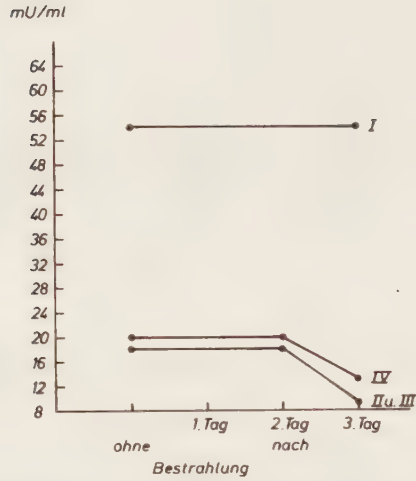


Abb. 16 GOT-Konzentrationen in den Tumorfraktionen am 11.Tag nach der Tumorzellimplantation

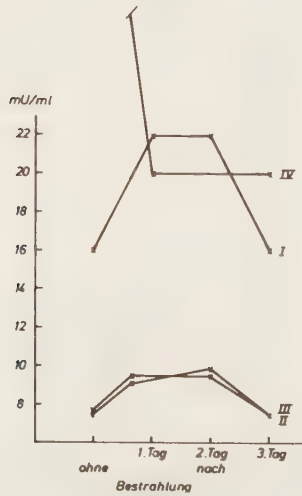


Abb. 17 GPT-Konzentrationen am 11.Tag nach der Tumorzellimplantation

VII. DISKUSSION

Die hohe LDH-Aktivität im Tumor und im Serum steht im Einklang mit den Ergebnissen vieler Voruntersucher und wird allgemein als Ausdruck der hohen Glykolyse des Tumors gewertet (17,26, 27,35,38,45,56,64-68,72-74,76,100,115,122,156,176-178a,184, 188,201,202,206).

Unter der Bestrahlung gibt es gegenüber den unbestrahlten Tieren einen Abfall der erhöhten Enzymwerte im Tumorgesamthomogenat, der mit dem makroskopisch feststellbaren Sistieren des Tumorwachstums einhergeht. Ob dies durch eine strahlenbedingte Schädigung der Enzymsynthese oder der Enzyme selber bedingt ist, läßt sich nicht entscheiden, obwohl ein Wiederanstieg der Aktivitäten, als "Erholungsreaktion" deutbar, einen dauerhaften Schaden ausschließt. Auch müssen reversible Membranschäden im Sinne des "enzyme release" in Betracht gezogen werden; ein Anstieg der Serum-LDH unter der Strahlenbehandlung findet sich allerdings nicht. In Anbetracht dessen, daß es sich nach der Elektrophorese in dem Tumorgewebe und bei den erhöhten Serumenzymwerten ausschließlich um das M_H -Isoenzym mit einer sehr kurzen Halbwertszeit von ca. 10 Stunden handelt, kann bei einem 24-stündigem Meßintervall durchaus ein kurzzeitiger Serumanstieg vorgelegen haben, ohne daß er bemerkt zu werden brauchte.

Bei der schrittweisen Zelldisintegration war zu erwarten, daß alle drei bestimmten Enzyme, da sie in großer Menge im Zytoplasma vorkommen, nach Zerstörung der Zellgrenzen mit einem Maximum in der I. Fraktion erscheinen. Dies ist auch, gleichgültig ob bestrahlt oder nicht, der Fall.

Bei der LDH und der GPT als unilokuläre Enzyme - der Zellkern bleibt dabei zunächst unberücksichtigt - war eine Abnahme der Aktivitäten im Maße der dem ersten Schritt nachfolgenden Verdünnung anzunehmen. Die GOT, als bilokuläres Enzym zusätzlich in den Mitochondrien anzutreffen, hätte ein zweites Maximum nach deren Zerstörung aufweisen müssen. Enthalten aber die Kerne eines dieser Enzyme, was nach SIEBERT für die LDH sicher in der prozentualen Größenordnung der zytoplasmatischen LDH-Aktivität zutrifft (152), dann müßten sie in der letzten Fraktion erscheinen, es sei denn, sie diffundierten allmählich während der Prozedur heraus und versteckten sich in den zytoplasmatischen Aktivitäten, womit nach SIEBERT gerechnet werden muß. Wie vermutet haben alle drei Enzyme bei den unbestrahlten Tumoren in der ersten Fraktion ein Maximum, aber sie verhalten sich anschließend nicht wie dem alleinigen Grad der Verdünnung nach zu erwarten wäre. Die LDH und GOT bleiben über 3 bzw. 2 Schritte auf gleicher Höhe, während die GPT sogar von Schritt III zu IV zu einem Maximum ansteigt. Der zu verzeichnende Zufluß an Aktivität kann aber neben den Kernen noch aus ungleicher Zellzerstörung - sowohl Krebs- und Stromagewebe als auch die malignen Zellen untereinander haben in Analogie zu ihrer Polymorphie eine unterschiedliche Resistenz gegenüber mechanischen und osmotischen Einflüssen - oder ungleichem Lösungsverhalten herrühren. Gemessen wurden die Enzymaktivitäten in den bei 100 000 g gewonnenen wässrigen Überständen. Nun hat sich aber seit den Untersuchungen von GREEN (zit.n.60) herausgestellt, daß die zytoplasmatischen Enzyme keineswegs in diesem "gelöst" schwimmen, sondern daß sie analog zu den mitochondrialen "Multienzymkomplexen" mit der Zytoplasmamembran verbundene "Enzymstraßen" darstellen, die unterschiedlich dissoziieren. So löst sich z.B. die Hexokinase schwer, die Phosphohexoisomerase leicht, andere liegen dazwischen. Das bedeutet aber, daß

die drei bestimmten Enzyme sich nicht in der eingangs geschilderten Weise gleichartig verhalten müssen und deshalb in ihrem Verlauf nur bedingt vergleichbar sind.

Aus dem gesagten ergibt sich insgesamt, daß man zu derartigen Untersuchungen extrem gleichartige Zellpopulationen verwenden sollte. Sowohl die LDH als auch die GOT zeigen kein zweites Maximum. Da aber das Vorkommen von GOT in Mitochondrien als gesichert gelten kann, deren Aktivität in unserem Falle in den Schritten II-IV zu suchen ist, ist wegen des Parallelverlaufs der LDH-Kurve für diese ebenfalls ein Kompartiment zu vermuten, welches Enzymaktivitäten abgibt, also mit großer Wahrscheinlichkeit der Kern. Die GPT ist entweder das sich am schlechtesten lösende Enzym oder es befinden sich große Mengen davon, größere als im Zellplasma, im Zellkern.

Nach der Bestrahlung findet sich eine Verschiebung der Maxima zur I. Fraktion hin. Dies ist sowohl bei der LDH als auch bei der GOT und GPT erkennbar. Das bedeutet aber, daß die vorher dichten Kompartimente, seien es aus ganzen Zellen bestehende Populationen oder Mitochondrien und Kerne nach Bestrahlung durchlässiger werden.

Der unterschiedliche Kurvenverlauf hierbei heißt aber, daß auch die Durchlässigkeitserhöhung nicht für jedes Enzym gleich ist.

Nach Bestrahlung zeigt sich bei der GPT immer noch ein Maximum in der IV. Fraktion, wenn auch von niedrigerem Absolutwert als bei nichtbestrahlten Tumortieren.

Eine Abgabe von LDH aus Zellkernen nach Bestrahlung wurde von HAGEN u.a. die Abgabe von GLDH aus Mitochondrien von STREFFER u.a. beobachtet (158). BAQC und ALEXANDER (14) sehen sogar in der Schädigung von Membranen die entscheidende biologische Strahlenwirkung.

Bei allen durchgeführten Elektrophoresen stellt sich nur das Isoenzym M_4 dar, so daß wir hier einer prozentualen Auswertung der einzelnen Isoenzyme entgehen waren. Dieser Befund stellt die extreme Situation des von mehreren Untersuchern gefundenen Trends der Isoenzyme in malignen Tumoren zu den kathodischen (=M) Fraktionen hin dar und ist im Zusammenhang mit der bei Transplantationstumoren ungewöhnlich hohen Glykolyserate als Ausdruck höchster De-differenzierung zu sehen. Auf diese Konstellation soll im Rahmen einer allgemeineren Betrachtung noch weiter eingegangen werden.

Nach ROUS und BERENBLUM (15) kann man die Tumorgenese formal in die beiden Stadien Initiation und Promotion unterteilen, BOUTWELL (20) und HECKER (62) fügten dieser die Phase der Progression hinzu. Die Initiation umfaßt dabei den tumorinduzierenden Vorgang, der in spezifischer Weise durch ein Kanzerogen bewirkt wird. Die anschließende Promotionsphase beinhaltet die Realisierung der Tumorinduktion durch relativ unspezifische Vorgänge. Die Progression zeigt den klinisch erkennbaren Tumor in seiner organoiden Eigengesetzlichkeit.

Die früheren biochemischen Hypothesen zur Kanzerisierung rückten jeweils einen Teilaspekt der Vielzahl von Tumorerkennungszeichen in den Vordergrund. So betonte WARBURG die Atmungsschädigung, MILLER und MILLER unterstrichen in ihrer Deletionshypothese den Verlust zytoplasmatischen Proteins durch spezifische Verbindung mit Kanzerogenen, POTTER formulierte in seiner "Catabolic Deletion-Theorie" den im Verlaufe von Kanzerisierungsvorgängen eintretenden Enzymverlust, und schließlich wurden in der "Feedback-Deletion-Theorie" Veränderungen der Regulation von Stoffwechselwegen für das Entstehen eines Krebses verantwortlich gemacht. Sie hatte den Nachweis von Regulationshindernissen auf extrazellulärer und zellulärer Ebene zur Grundlage, wobei sich die Tumorzellen gegenüber Normalzellen durch eine ausgeprägte "Korrelationstauheit" auszeichneten.

HECKER faßte dann die Vielzahl der im molekularen Bereich der Krebsentstehung bekannten Befunde in seiner "Informationshypothese zur Tumorgenese" zusammen, die in einer Änderung von Informationsgehalten durch Mutation oder Transformation von DNS sowie von RNS auf der Ebene von Transscription oder Translation ebenso wie in einer Änderung von intra- und extrazellulären Regulationsmechanismen etwa durch Mutation von Regulatororganen oder durch Verlust regulatorischer Proteine besteht.

Im Abriß dieser Kanzerisierungshypothesen erscheint das Vorkommen einer hohen LDH-Aktivität eines Tumors als Ausdruck verstärkter Glykolyse und die Konvergenz der ursprünglich vielfältigen Enzymausstattung auf eine einfachere im Tumorgeschehen nicht Ursache sondern Folgeerscheinung der Tumorentstehung. So sieht SCHMIDT (144a) das Auftreten hoher glykolytischer Aktivitäten als Deletionsfolge nach eingetretener Malignisierung an, also als Ereignis der Progressionsphase. POTTER selbst vertritt die Ansicht, daß die Deletion kataboler Enzyme kein Initialereignis sondern eine sekundäre Reaktion darstelle. Schließlich ordnet HECKER alle bisher gefundenen Enzymabweichungen der Progressionsphase zu.

Eine Krebsfrüherkennung in dem Sinne, die molekularen Bereiche der Initiations- und teilweise Promotionsphase mit serumdiagnostischen Mitteln möglich zu machen, ist also unmöglich. Tumorfrühdiagnostik kann nur heißen, ihn in der frühen Promotionsphase (carcinoma in situ?) zu erkennen, in einem Stadium, in dem Tumoreigenheiten wie erhöhte Glykolyse durchaus vorhanden sein können. Hier aber erhebt sich ein quantitatives Problem: Wie groß muß ein Tumor sein, um die Meßgröße Serum-LDH signifikant verändern zu können und wieviel "tumorcharakteristische" LDH muß abgegeben werden, um im Serum einen spezifischen Hinweis zu erhalten?

Die Angaben in der Literatur über erhöhte Serum-LDH bei Labortieren sind übereinstimmend. Aber hierbei handelt es sich ausnahmslos um sehr weit fortgeschrittene Geschwülste. Bei "minimal deviation Hepatomas" (125-127) weicht sie kaum ab. In unserem Falle stand uns das Walker Carcinom zur Verfügung, das am 11. Tag nach Transplantation auf fast 10 g herangewachsen war. Das Körpergewicht der Tiere betrug durchschnittlich 250 g. Diese Relationen sind auf menschliche Verhältnisse kaum übertragbar. Bei menschlichen Krebserkrankungen werden auch nur im Bereich von 40-60% LDH-Erhöhungen (206) gesehen und dabei taucht immer schon der Verdacht auf, es seien Patienten mit weit fortgeschrittenen Tumoren darunter. Zutreffend wird daher oft von der LDH-Erhöhung als von der "Tumormasse" herrührend gesprochen. Die Angaben, welche Isoenzyme vornehmlich in Tumoren anzutreffen seien, in "Mustern" zusammengestellt, sind uneinheitlich; von tumorspezifischen Serummustern kann bisher keine Rede sein. RICHTERICH bezeichnet kurzum die Serumisoenzymdiagnostik im Hinblick auf Tumoren als wertlos (153-55,209).

Am konstantesten findet man noch die von PFLEIDERER u.a. formulierten Beobachtungen, in Tumoren bestehe ein Trend zu den M-Formen, was bei uns ebenfalls zutraf. Die Autoren unterlegen dabei teleologisch, daß dem Tumor dabei eine LDH-Form zur Verfügung stehe, die unter anaeroben Bedingungen besser arbeiten könne. Bedingungen also, dem der Tumor mit seinem niedrigen pO_2 nahe kommt. WACHSMUTH (171) betonte, daß der doppelte Chromosomensatz notwendig sei, die reinen Isoenzyme M_4 und H_4 zu bilden. Die Hybride entstehen durch freie, d.h. binominale, Kombination der frei dissoziablen Untereinheiten (8,10, 24,32,33,46,61,77,103,104). In den mindestens diploiden Tumorzellen treffen wir aber in unserem Falle nur ein Genprodukt an. Die Ursache dafür kennen wir nicht. Eine Genommutation wie sie in Tumoren häufig ist, könnte höchstens eine Erhöhung der Gesamt-LDH erklären, nicht aber das Verschwinden eines Gen-

produktes. Man könnte vermuten, daß Repressoren einseitig die Bildung von H_4 verhindern, oder daß durch Mutation ein enzymatisch unwirksames "stummes" Genprodukt gebildet wird. Aber es ist nicht einzusehen, weshalb durch diese Mechanismen nicht in gleicher Weise auch das M_4 verantwortliche Gen betroffen werden sollte. Bis auf wenige Ausnahmen sind aber " H_4 -Tumoren" unbekannt. Dem Stoffwechselverhalten in Tumoren nach könnte der M_4 -Synthese ein selektiver Wert zukommen. Nicht ohne weiteres erklärt werden kann weiterhin der hohe LDH-Gehalt vieler normaler Organe, ganz abgesehen von den extrem erhöhten der Transplantationstumoren, die weitaus höher liegen als es die Glykolyserate erfordert (137). Auch sind Wachstumsrate und Malignitätsgrad per se nicht notwendigerweise mit einem erhöhten LDH-Gehalt verbunden. Im Zusammenhang mit den Versuchsergebnissen von STECK u.a. (157), daß mit Rous-Sarkom-Virus infizierte Zellkulturen unter bestimmten Umständen besser wachsen und eine erhöhte Glykolyse zeigen, muß man daran denken, daß z.B. Viren in der Lage sind, eine Umkodierung innerhalb der Zelle vorzunehmen, ohne daß dies "sinnvoll" sein muß. Durch derartige Interferenzen kann durch Änderung von Informationsgehalten der Kontrolle durch übergeordnete Systeme vorgegriffen und eine Luxussynthese auch eines Enzyms z.B. der LDH bewirkt werden. In der Höhe sinnlos bedeutet ihr grundsätzliches Vorhandensein die Sicherung eines einfachen Energiesystems. Es können viele Umfunktionierungen innerhalb der Krebszelle vorkommen. Unter Aufgabe spezieller Funktionen muß ein Minimum an Organisation erhalten bleiben, die Energiegewinnung, Teilungsfähigkeit und zelluläre Integrität erlauben. So hat ein Fehlen dieses oder jenes Enzyms oder dieser und jener morphologischen Eigenschaft gezeigt, daß sie zum Leben entbehrlich sind; ein Tumor ohne LDH ist nicht bekannt. Unter Anwendung der HECKERSchen Hypothese meinen wir also, daß die LDH-Erhöhung durch eine Änderung von Informationsgehalten auf zellulärer Ebene zurück-

zuführen ist. Die Aktivitätshöhe wird dabei nicht durch Umweltliche Regelgrößen sondern das Ausmaß der Regulationsstörung bestimmt. Der M_4 -LDH kommt dabei ein umgebungsbedingter Selektionswert zu.

An anderer Stelle hatten wir schon einmal von auf die Spitze getriebener Konvergenz gesprochen, wenn wir an unsere Beobachtung einer ausschließlich aus M_4 bestehenden LDH dachten. Daraus wird die extreme Konvergenz mit der bei unseren Untersuchungen ausschließlich aus M_4 bestehenden LDH verständlich. Es sind eben nur jene weit progredienten Transplantations-tumoren, die einen solchen Befund mit eindeutiger Serumrepräsentation eines Tumor-LDH-Isdenzyms bieten.

Abschließend kann gesagt werden, daß die LDH in der Tumorfürhdiagnostik kaum je Bedeutung erlangen wird. Generell kommt ihr bei der Tumorsuche, vergleichbar etwa mit der BSG, die Rolle eines Screening-Tests zu. Bei einer festgestellten Geschwulst kann sie Hinweise auf eine eingetretene Metastasierung geben (27) und der Verlaufskontrolle dienen (17). Die Isoenzymdiagnostik erweitert die diagnostischen Mittel kaum.

VIII. ZUSAMMENFASSUNG

In der Einleitung wurde die LDH in ihrer biochemischen Funktion charakterisiert sowie die theoretischen Grundlagen der LDH als Mittel zur Diagnose der Krebskrankheit dargestellt, woraus sich der Ansatz der Fragestellung zum vorliegenden Thema ergab.

In dem Kapitel über Material und Methode erschien die angewandte Versuchsanordnung. In Anlehnung an die Methode von DELBRÜCK u.a. wurde das Verhalten von LDH, GOT und GPT in aufeinanderfolgenden Aufbereitungen ein und desselben Gewebes ohne und mit Strahlenbehandlung beobachtet. Parallel dazu wurden die entsprechenden Blutwerte bestimmt sowie die Agar-Gel Isoenzymauftrennung der LDH durchgeführt.

In Vorversuchen war es unser Anliegen, methodenimmanente Störfaktoren zu erkennen und sie gegebenenfalls zu eliminieren, weiterhin eine Tumorzellkernfraktion darzustellen und daraus die Isoenzymfraktionen aufzutrennen.

Wir konnten dabei folgende Ergebnisse gewinnen.

1. Bei dem 11 Tage alten Walker-Carcinom der Ratte sind sowohl Tumorgesamt-LDH wie auch Serum-Gesamt-LDH erhöht. Die Röntgenbestrahlung ändert nichts daran.
2. Im Tumorgewebe findet sich vornehmlich das M_4 -Isoenzym, zu dessen Gunsten sich auch die Tumorseren verändern.
3. In den Gewebeaufbereitungen verhalten sich LDH, GOT und GPT wie es ihrem Vorkommen in den Zellkompartimenten entspricht, jedoch scheinen sich alle drei Enzyme in ihren Lösungsverhalten zu unterscheiden. Röntgenbestrahlung führt zu einem früheren Ausschleusen dieser Enzyme im Sinne eines "enzyme release".

4. Eine unterschiedliche Isoenzymkonstellation Plasma/Kern, soweit die Methodik darüber Aussage erlaubt, ließ sich nicht finden.

In der Diskussion wurden die eigenen Ergebnisse in den Rahmen der Krebstheorien allen voran der Informationshypothese zur Tumorgenese HECKERS gestellt. Dieser Abschnitt wurde mit einer kritischen Würdigung der LDH-Tumordiagnostik abgeschlossen, in der festgestellt wurde, daß der LDH zur Tumordiagnostik keine pathognomonische Bedeutung zukommt, daß die Isoenzymkonstellationen keine einschlägigen diagnostischen Hilfsmittel darstellen und beides auch in der Frühdiagnose der Krebskrankheit keine Rolle spielen kann.

LITERATURVERZEICHNIS

1. Adebonojo, F.O., Bensch, K.G., and King, D.W.,
The Effect of Nitrogen on the Enzymatic Pattern of Strain L
Cells.
Cancer Res. 21 252-56 1961.
2. Adelstein, S.J., Coenzyme Binding by X-Irradiated Glutamate
and Lactate Dehydrogenase.
Biochemistry 4/5 891-96 1965.
3. Aisenberg, A.C., and Morris, H.P.,
Energy Pathways of Hepatoma H-35 and 7800
Cancer Res. 566-68 23 1963.
4. Aisenberg, A.C., Sugar Phosphate Levels in the Mitochondrial
Pasteur Effect.
J. Biol. Chem. 234 441-44 1959.
5. Alfrey, V.G., Studies of Energy-Yielding Reactions in
Isolated Cell Nuclei. In: H. Busch, The Nucleus of the
Cancer Cell.
Exptl. Cell Res. Suppl. 9 418-429 1963.
6. Amoroso, C. et al.
Über den Einfluß von Röntgen-Ganzkörperbestrahlung auf die
Aktivität der Milchsäuredehydrogenase im Blutserum und
in Organextrakten bei Ratten.
Strahlentherapie 121 269-80 1963.
7. Anderson, S.R., and Weber, G.,
Multiplicity of Binding by LDH.
Biochemistry 4/10 1948-57 1965.
8. Anderson, S.R., and Weber, G.,
The Reversible Acid Dissoziation and Hybridization of Lactic
Dehydrogenase.
Arch. Biochem. 116 1-3 1966.
9. Angeletti, P.U., Suntzeff, V., and Moore, B.W.,
Chromatographic Patterns of Protein and Enzymes in
Extracts of Rhabdomyosarcoma and Muscle in Mice.
Cancer Res. 20 1229-34 1960.
10. Appella, E., and Markert C.L.,
Dissociation of Lactic Dehydrogenase into subunits with
Guanidine Hydrochloride.
Biochem Biophys. Res. Commun. 6 171-76 1961.

11. Auerbach, V.H., and Waisman, H.A.,
Amino Acid Metabolism of Novikoff Hepatoma.
Cancer Res. 18 543-47 1958.
12. Bär, U., Schmidt, E. und F.W. Schmidt,
Enzym-Muster und Isoenzyme menschlicher Tumoren.
Klin. Wschr. 41 977-88 1963.
13. Bär, U. und Ohlendorf, S.,
Studien zur Enzymelimination. I. Halbwertszeiten einiger
Zellenzyme.
Klin. Wschr. 48 776-80 1970.
14. Bacq, Z.M., and Alexander P.,
Fundamentals in Radiobiology. 2nd edition, Oxford, London,
Edinburgh, New York, Toronto, Paris, Frankfurt, Pergamon Press
1966.
15. Berenblum, I., and Haran, N.,
Brit. J. Cancer 9 268 1955 zitiert nach Hecker.
16. Beheim, P. und Jann, W.S.,
Isolierung von Zellkernen aus Normalgeweben und dem Walker-
Carcinom der Ratte.
Materia Medica Nordmark, Uetersen 618-21 1968.
17. Biermann, H.R., Hill, B.R., Reinhardt, L., and Emory, E.,
Correlation of Serum Lactic Dehydrogenase Activity with
the Clinical Status of Patients with Cancer, Lymphomas
and the Leukemias.
Cancer Res. 17 660-67 1957.
18. Blanco, A., Zinkham, W.H., and Kupchik, L.,
Genetic Control and Ontogeny of LDH in Pigeon Testes.
J. Exper. Zool. 156/2 137-52 1964.
19. Bonavita, V., Ponte F., and Amore, G.,
Lactate Dehydrogenase Isozymes in the Developing Rat Brain.
Nature 196 576-77 1962.
20. Boutwell, R.K.,
Prog. exper. Tumor Res. Vol. 4 Basel, New York: S. Karger.
207-50 1964.
21. Boxer, G.E., and Shonk, C.E.,
Low Levels of Soluble DPN-linked alpha-Glycerophosphat-
dehydrogenase in Tumors.
Cancer Res. 85-91 20 1960.
22. Boxer, G.E., and Devlin, T.M.,
Pathways of Intracellular Hydrogen Transport.
Science 134 1495-1501 1961.

23. Boyd, J.W.,
The Rates of Disappearance of L-Lactate Dehydrogenase
Isoenzymes from Plasma.
Biochim. Biophys. Acta 132/2 221-31 1967.
24. Boyer, S.H., Fainer D., C., and Watson-Williams, E.J.,
Lactate Dehydrogenase Variant from Human Blood: Evidence for
Molecular Subunits.
Science 141 642-43 1963.
25. Braun, H., Hornung, G. und Neumeyer, M.,
Aktivitätsänderungen der GOT und GPT in Herz, Leber,
Nieren und im Serum von ganzkörperbestrahlten Ratten.
Strahlentherapie 126, 454-64 1965.
26. Brindley, C.O., and Francis, F.L.,
Serum Lactic Dehydrogenase and Glutamic Oxalacetic
Transaminase Correlations with Measurements of Tumor Masses
During Therapy.
Cancer Res. 23 112-17 1963.
27. Buchelt, L. und Heß, F.,
Über das Verhalten der Serumenzyme LDH, GOT und GPT bei
Geschwulsterkrankungen und die Möglichkeit diagnostischer
und prognostischer Folgerungen.
Strahlentherapie 136 574-79 1968.
28. Burk, D., and Shade, A.L.,
On Respiratory Impairment in Cancer Cells
Science 124 270-71 1956.
29. Burk, D., Woods, M., and Hunter, J.,
On the Significance of Glucolysis for Cancer Growth, with
Special Reference to Morris Hepatomas.
J. Nat. Cancer Inst. 38 839-63 1967.
30. Cahn, R.D., Kaplan, N.O., Levine, L., and Zwilling, E.,
Nature and Development of Lactic Dehydrogenase.
Science 136 962-69 1962.
31. Ceriotti, G.,
A Microchemical Determination of Desoxyribonucleic
Acid.
Biochem. J. 16 297-303 1952.
32. Chilson, O.P., Kitto, G.B., and Kaplan, N.O.,
Factors Affecting the Reversible Dissociation of
Dehydrogenases.
Proc. Nat. Acad. Sci. 53/5 1006-14 1965.
33. Chilson, O.P., Costello, L.A., and Kaplan, N.O.,
Studies on the Mechanism of Hybridization of Lactic
Dehydrogenases in Vitro.
Biochemistry 4/2 271-81 1965.

34. Cohen,L., and Larson,L.,
Activation of Serum Lactic Dehydrogenase
New Engl.J.Med. 275/9 465-70 1966.
35. Crispens,C.G.,
Serum Lactic Dehydrogenase Levels in Mice during the
Development of Authochthonus and Chemically Induced Tumors.
J.Natl.Cancer Inst. 30 361-66 1963.
36. Delbrück,A., Zebe,E. und Bücher,Th.,
Über Verteilungsmuster von Enzymen des Energie liefernden
Stoffwechsels im Flugmuskel, Sprungmuskel und Fettkörper
von Locusta migratoria und ihre cytologische Zuordnung.
Biochem.Z. 331 273-96 1959.
37. Delbrück,A., Schimassek,H., Bartsch,K. und Bücher,Th.,
Enzym-Verteilungsmuster in einigen Organen und in experi-
mentellen Tumoren der Ratte und der Maus.
Biochem.Z. 332 297-311 1959.
38. De Roethth,H.,
Chemical Characteristics and Varying Degress of Malignancy
in Tumors of the Human Ovary. I.Oxygen Consumption and
Lactic Acid Production.
Cancer Res. 17 833-40 1957.
39. Dounce,A.,
The Isolation of Nuclei form Tumor Cells. In: H.Busch,
The Nucleus of the Cancer Cell.
Exptl.Cell.Res. Suppl.9 126-43 1963.
40. Eagle,H., Barban,St., Levy,M., and Schulze,H.,
The Utilization of Carbohydrates by Human Cell Cultures.
J.Biol.Chem. 233 551-58 1958.
41. Fiala,S., and Fiala,A.E.,
Prevention of Adaptive Formation of Tryptophan Peroxidase
by a Carcinogenetic Azo Dye.
Nature 183 1532-33 1959.
42. Fieldhouse,B., and Masters,C.J.,
Developmental Redistribution of Porcine Lactate
Dehydrogenase.
Biochim.Biophys.Acta 118/3 538-48 1966.
43. Fine,I.H., Kaplan,N.O., and Kuftinec,D.K.,
Developmental Changes of Mammalian Lactic Dehydrogenase.
Biochemistry 2 116-21 1963.

44. Fleisher, G.A., and Wakim, K.G.,
Disappearance-Rates of Glutamic Pyruvic Transaminase under
Various Conditions.
J.Sab.clin.Med. 61 76 1963.
45. Friend, C., and Wroblewski, F.,
Lactic Dehydrogenase Activity of Serum in Mice with
Transplanted Leukemias.
Science 124 173-74 1956.
46. Fritz, P.J., and Jacobsohn, K.B.,
Multiple Molecular Forms of LDH.
Biochemistry 4/2 282-89 1965.
47. Fromm, H.H.,
The Nature of Pyruvate Involved in the Enzymic Formation
of Lactate in the Rabbit Muscle LDH.
Biochim.Biophys.Acta 99/3 540-42 1965.
48. Gatt, S., and Racker, E.,
Regulatory Mechanism in Carbohydrate Metabolism.
I. Crabtree-Effect in Reconstructed Systems.
J.Biol.Chem. 234 1015-23 1959.
49. Gatt, S., and Racker, E.,
II. Pasteur-Effect in Reconstructed Systems.
J.Biol.Chem. 234 1024-28 1959.
50. Gelderman, A.M., and Peacock, A.C.,
Increased Specific Activity and Formation of an Inhibitor
from the LDH₅-Isozyme of LDH.
Biochemistry 4/8 1511-18 1965.
51. Goldman, R.D., Kaplan, N.O., and Hall, T.C.,
Lactic Dehydrogenase in Human Neoplastic Tissues.
Cancer Res. 24 389-99 1964.
52. Goldblatt, H., and Cameron, G.,
Induced Malignancy in Cells from Rat Myocardium Subjected
to Inter Mittant Anaerobiasis During Long Propagation in
Vitro.
J.Exp.Med. 97 525-52 1953.
53. Görlich, M.,
Der Glukosestoffwechsel der Tumoren und seine Beziehungen
zu den verschiedenen Theorien der Biochemie des Krebses.
Arch.Geschwulstforsch. 35/3 261-77 1970.
54. Graff, S., Moser, H., Kastner, O., Graff, A.N., and
Tannenbaum, M.,
The Significance of Glycolysis.
J.Natl.Cancer Inst. 34 511-19 1965.

55. Graffi, A.,
Betrachtungen zu den Theorien der Krebsentstehung.
Arch. Geschwulstforsch. 22 13-41 1964.
56. Greenstein, J. P.,
Some Biochemical Characteristics of Morphologically
Separable Cancers.
Cancer Res. 16 641-53 1956.
57. Greenstein, J. P.,
Biochemistry of Cancer. 2nd ed. New York Acad. Press 1954.
58. Gregory, K. F., Ng, C. W., and Pantekoeck, J. F. C. A.,
Antibody to Lactate Dehydrogenase. I. Inhibition of
Glycolysis in Tumor and Liver Homogenates.
Biochim. Biophys. Acta 130/2 469-76 1966.
59. Greiff, D., and Kelly, R. T.,
Cryotolerance of Enzymes. I. Freezing of LDH.
Cryobiology 2/6 335-41 1966.
60. Grimmer, G.,
Biochemie Hochschultaschenbücher Verlag, Bibliographisches
Institut Mannheim 1970.
61. Hathaway, G., and Criddle, R. S.,
Substrate-Dependant Association of Lactic Dehydrogenase
Subunits to Active Tetramer.
Proc. Nat. Acad. Sci. USA 56/2 680-85 1966.
62. Hecker, E.,
Biochemische und molekular-biologische Probleme der
Tumorgenese.
Arzneimittelforsch. 18 978-88 1968.
63. Hess, B., and Chance, B.,
Metabolic Control Mechanisms. IV. Chemical Events after
Glucose Addition to Ascites Tumor Cells.
J. Biol. Chem. 236 239-46 1961.
64. Hilf, R., Michel, I., Bell, C., Freeman, J. J., and Borman, A.,
Biochemical and Morphologic Properties of a New
Lactating Mammary Tumor Line in the Rat.
Cancer Res. 25 286-99 1965.
65. Hill, B. R., and Jordan, R. T.,
Serum Lactic Dehydrogenase Activity in Transplanted
Leukemia of Mice.
Proc. Am. Assoc. Cancer Res. 2 117 1956.
66. Hill, B. R., and Jordan, R. T.,
Serum Lactic Dehydrogenase Activity in Mice with
Transplantable Leukemia.
Cancer Res. 17 144-47 1957.

67. Hill, B.R., and Levi, C.,
Elevation of a Serum Component in Neoplastic Disease.
Cancer Res. 14 513-15 1954.
68. Hill, J.H.,
Serum Lactic Dehydrogenase in Cancer Patients.
J.Natl.Cancer Inst. 18 307-13 1957.
69. Hinks, M., and Masters, C.J.,
Developmental Changes in Ruminant LDH.
Biochemistry 3/11 517-21 1964.
70. Holbrook, J.J.,
Die Bedeutung von SH-Gruppen für die enzymatische
Aktivität. V. Die Coenzym Bindungskapazität der
Schweineherz-Laktatdehydrogenase. Isoenzyme I nach
Inhibition mit verschiedenen Maleiniden.
Biochem.Z. 344/2 141-52 1966.
71. Holbrook, J.J., and Jeckel, R.,
Reversible Covalent Modification of the Essential Cystine
Residues of Pig Heart Lactic Dehydrogenase.
Arch.Biochem. 122/2 519-21 1967.
72. Hsieh, K.M., and Blumenthal, H.T.,
Serum Lactic Dehydrogenase Levels in Various Disease
States.
Proc.Soc.Exp.Biol.Med. 91 626-30 1956.
73. Hsieh, K.M., Mao, S.S., and Sasamanonth, K.,
Serum Lactic Dehydrogenase Activity after Excision of
Transplanted Tumors.
Cancer Res. 19 700-04 1959.
74. Hsieh, K.M., Suntzeff, V., and Cowdry, E.V.,
Comparative Study of Serum Lactic Dehydrogenase Activity
in Mice with Transplanted and Induced Tumors.
Cancer Res. 16 237-39 1956.
75. Hudack, E.D., and Brummond, D.O.,
Studies on Ehrlich Ascites Cell Nuclei. III. Enzymatic
Analysis of Cytoplasmic Contamination of Nuclei
Isolated from the Ehrlich Ascites Tumor.
Exptl.Cell Res. 22 345-55 1961.
76. Jacobsohn, K.B., and Nishio, K.,
Studies on the Plasma Lactic Dehydrogenase in Mice with
Myeloid Leukemia. II. On the Site of Production of the
Enzyme.
Cancer Res. 23 344-48 1963.

77. Jaenicke, R.,
Molecular Weight and Molecular Structure of Multiple
Forms of LDH. II. Isozymes of Myocardial Type.
Biochim. Biophys. Acta 85/2 367-73 1964.
78. Jonderko, G.,
Effect of Heavy Metal Salts on the Activity of LDH.
Pol. Arch. Med. Wewnet 34/12 57-66 1964.
79. Kannugo, M.S., and Singh, S.N.,
Effect of Age on the Isozymes of LDH of the Heart and
Brain of Rat.
Biophys. Res. Commun. 21/5 454-59 1965.
80. Kaplan, N.O., and Ciotti, M.M.,
Evolution and Differentiation of Dehydrogenases.
Ann. N.Y. Acad. Sci. 94 701-20 1961.
81. Kaplan, N.O.,
Lactate Dehydrogenase-Structure and Function. Brookhaven
Symposia in Biology, Nr. 17 Subunit Structure of Proteins
131 1964.
82. Kaplan, N.O., Ciotti, M.M., Hamolsky M., and Bieber, R.E.,
Molecular Heterogeneity and Evolution of Enzymes.
Science 131 392-97 1960.
83. Kärcher, K.H., Kato, H.T. und Schleich, A.,
Die Veränderungen der Isoenzyme der LDH. II. Mitteilung:
Enzymatische und morphologische Untersuchungen an Tumor-
zellkulturen.
Strahlentherapie 127 229-44 1965.
84. Kärcher, K.H. und Kato, H.T.,
Die Veränderungen der Isoenzyme der LDH nach Einwirkung
ionisierender Strahlen. I. Mitteilung: Das Verhalten der
Isoenzyme der LDH in Serum und Gewebshomogenaten ganz-
körperbestrahlter Ratten.
Strahlentherapie 125 548-66 1964.
85. Kärcher, K.H.,
Enzymatische und histochemische Veränderungen nach Ein-
wirkung ionisierender Strahlen. Teil I. Die Bedeutung
der Untersuchung verschiedener Fermente im Serum Tumor-
kranker während der Strahlentherapie.
Strahlentherapie 118 250-75 1962.
86. Karlson, P.,
Kurzes Lehrbuch der Biochemie.
Thieme Verlag 5 Aufl. 1967
87. Keck, K.,
An Ultramicro Technique for the Determination of
Deoxypentose Nucleic Acid.
Arch. of Biochem. and Biophys. 63 446-51 1956.

88. Kiricuta, I., Mustea, I., Rogozan, I., and Simu, G.,
Relations between Tumor and Metastasis.
Cancer 18 978-84 1965.
89. Koen, A.L., and Shaw, C.R.,
Studies on LDH Tissue-Specific Isozymes: Electrophoretic
Migration of Isolated Sub-Bands.
Biochim.Biophys.Acta 96/2 231-36 1965.
90. Koen, A.L.,
A Tissue-Specific Shift in Lactate Dehydrogenase Sub-Band
Patterns of the House Mouse.
Biochim.Biophys.Acta 140/3 487-95 1967.
91. Koller, P.C.,
The Nucleus of the Cancer Cell. - A Historical Review. -
In: H.Busch, The Nucleus of the Cancer Cell.
Exptl.Cell Res. Supplem. 9 1963.
92. Kreutzer, H.H., and Jacobs, P.,
Relative Mobilities of LDH Isozymes in Human Blood Serum
after Addition of NAD.
Clin.Chim.Acta 11/2 184-87 1965.
93. Kreutzer, H.H., Jacobs, P., and Francke, C.,
LDH Isozymes: Irregularities in Electrophoretic Mobility.
Clin.Chim.Acta 11/2 159-69 1965.
94. Kuchl, L.,
Evidence for Nuclear Synthesis of Lactic Dehydrogenase
in Rat Liver.
J.Biol.Chem. 242/9 2199-2206 1967.
95. Lehninger, A.L.,
Bioenergetic.
Thieme Verlag Stuttgart 1970.
96. Lenz, W.,
Medizinische Genetik.
Thieme Verlag Stuttgart, 2.Aufl. 1970.
97. Lindy, S., and Konttinen, A.,
The Effect of Pyruvate on Urea-Induced Inhibition of Lactic
Dehydrogenase Isozymes.
Clin.Schim.Acta 14/5 615-18 1966.
98. Lohmann, W., Moss, Jr., J., and Perkins, W.H.,
Intermolecular Reactions between Glycerol and LDH.
Influence on the Radiation Sensivity of the Enzyme.
J.Nucl.Med. 5/4 37-41 1964.
99. Luca, de, C., and Nitowski, H.M.,
Variations in Enzyme Activities during The Growth of
Mammalian Cells in Vitro: Lactic Dehydrogenase and Glucose-
6-Phosphat-Dehydrogenase.
Biochim.Biophys. Acta 89/2 867-70 1964.

100. Lührs, W.,
Über das Vorkommen von LDH im Serum krebskranker Patienten.
Klin. Wschr. 34 148-49 1956.
101. Maley, G.F., and Maley, F.,
Nucleotide Interconversions in Embryonic and Neoplastic
Tissue.
J. Biol. Chem. 234 2975-80 1959.
102. Manso, C., Sugiura, K., and Wroblewski, F.,
Gluthione Reductase and Lactic Dehydrogenase Activities
of Tissues of Rodents with Transplanted Tumors.
Cancer Res. 18 682-86 1958.
103. Markert, C.L.,
Isozymes in Kidney Development: In: Proceedings of the
Thirteenth Annual Conferende on the Kidney - Hereditary,
Developmental, and Immunologic Aspects of Kidney Disease.
J. Metcoff, Ed. Northwestern Univ. Press, Evanston Ill.
54-63 1962.
104. Markert, C.L.,
Epigenetic Control of Specific Protein Synthesis in
Differentiating Cells. In: Cytodifferentiation and
Macromolecular Synthesis.
Acad. Press, New York, N.Y. 65-84 1963.
105. Markert, C.L., and Möller, F.,
Multiple Forms of Enzymes: Tissue, Ontogenetic, and
Species Specific Patterns.
Proc. Nat. Acad. Sci. 45 753-65 1959.
106. Mcbeth, R.A.L., and Bekesy, J.G.,
Oxygen Consumption and Anaerobic Glycolysis of Human
Malignant and Normal Tissue.
Cancer Res. 22 244-48 1962.
107. Meister, A.,
Reduction of alpha-, gamma-diketo, and alphaketoacids
catalized by Muscle Preparations and by Cristalline
Lactic Dehydrogenase.
J. Biol. Chem. 184 117-29 1950.
108. Meister, A.,
Lactic Dehydrogenase Activity of Certain Tumors and
Normal Tissues.
J. Natl. Cancer Inst. 10 1263-71 1950.
109. Merten, R. und Solbach, H.G.,
Enzymverteilungsmuster des glykolytischen Systems und
Citronensäurezyklus im Plasma Krebskranker.
Klin. Wschr. 39/5 222-32 1961.
110. Mirsky, A.E.,
Some Problems in the Study of Nuclear Enzymes. In: The
Cell Nucleus.
J.S. Mitchell F.R.S., Chairman Butterworths Scienific
Public. 1960.

111. Mori, M., and Kawakatsu, K.,
Histochemical Evaluation of Enzymatic Activities in
Human Squamous-Cell Cancer.
Cancer Res. 25 539-45 1963.
- 111a. Morris, H. P.,
Studies on the Development, Biochemistry and Biology of
Experimental Hepatomas.
Adv. Cancer Res. 9 227-302 1965.
112. Nance, W. E., Claflin, A., and Smithies, O.,
Lactic Dehydrogenase: Genetic Control in Man.
Science 142 1075-77 1963.
113. Nebel, E. J., and Conklin, J. L.,
Development of LDH Isozymes in the Chick Embryo.
Proc. Soc. Exp. Biol. 115/2 618-22 1964.
114. Neillands, J. B.,
Studies on Lactic Dehydrogenase of Heart. 1. Purity,
kinetics and Equilibria.
J. Biol. Chem. 199 373-83 1952.
115. Nishio, K., Jacobsohn, K. B., Jenkins, V. K., and Upton, A. C.,
Studies on Plasma Lactic Dehydrogenase in Mice with
Myeloid Leukemia. 1. Relation of Enzyme Level to Course of
Disease.
Cancer Res. 23 340-43 1963.
116. Ono, T., Blair, R., Potter, V. R., and Morris, H. P.,
The Comparative Enzymology and Cell Origin of Rat
Hepatomas. IV. Pyrimidine Metabolism in Minimal Deviation
Tumors.
Cancer Res. 23 240-49 1963.
117. Ottolenghi, P., and Denstedt, O. F.,
Can. J. Biochem. Physiol. 36 1075 1958.
118. Papaconstantinou, J., and Colowick, S. P.,
The Role of Glycolysis in the Growth of Tumor Cells.
1. Effects of Oxamic Acid on the Metabolism of Ehrlich
Ascites Tumor Cells.
J. Biol. Chem. 236 278-84 1961.
119. Pesce, A., Fondy, D. P., Stolzenbach, F., Castillo, F., and
Kaplan, N. O.,
The Comparative Enzymology of Lactic Dehydrogenases.
III. Properties of the H₄ and M₄ Enzymes from a Number of
Vertebrates.
J. Biol. Chem. 242/9 2151-67 1967.
120. Pfeleiderer, S. und Wachsmuth, E. D.,
Alters- und funktionsabhängige Differenzierung der
LDH menschlicher Organe.
Biochem. Z. 334 185-98 1961.

121. Pfleiderer, G. und Wachsmuth, E.D.,
Die Heterogenität der Laktatdehydrogenase in Entwick-
lungsgeschichte und Pathologie des Menschen.
Klin. Wschr. 39/7 352-54 1961.
122. Pitot, H.C.,
Some Biochemical Essentials of Malignancy.
Cancer Res. 23 1474-82 1963.
- 122a. Pitot, H.C., and Heidelberger, C.,
Metabolic Regulatory Circuits and Carcinogenesis.
Cancer Res. 23 1694-1700 1964.
123. Plagemann, R.G.W., Gregory, K.F., and Wroblewski, F.,
The Electrophoretically Distinct Forms of Mammalian
Lactic Dehydrogenases. I. Distribution of Lactic
Dehydrogenases in Rabbit and Human Tissues.
J. Biol. Chem. 235 2282-87 1960.
124. Posnanska, Linde,
Lactate Dehydrogenase Isozymes in Malignant Tissues.
Nature 209 727-28 1966.
125. Potter, van R.,
Biochemical Perspectives in Cancer Research.
Cancer Res. 24 1085-98
126. Potter, van R.,
The Biochemical Approach to the Cancer Problem.
Fed. Proc. 17 691-97 1958.
127. Potter, van R.,
Biochemical Uniformity and Heterogeneity in Cancer Tissue.
Cancer Res. 16 641-53 1956.
128. Prochazka, B., Jirasek, V., Barta, V., Kohout, J., Korbova, L.,
Schlupek, A., and Zdenek, Slezak,
Differences in Lactate Dehydrogenase Isoenzyme Patterns
in Fundus and Pylorus of the Rat Stomach.
Gastroenterology 54/1 60-71 1968.
129. Pütter, J.,
Stoffwechselwirkung von Äthyleniminochinonen.
Arzneimittelforsch. 10 8-12 1960.
130. Rabinowitz, Y., and Dietz, A.,
Genetic Control of Lactate Dehydrogenase and Malate
Dehydrogenase Isozymes in Cultures of Lymphocytes and
Granulocytes: Effect of Addition of Phytohemagglutinin,
Actin mycin D or Puromycin.
Biochi. Biophys. Acta 139/2 254-64 1967.

131. Rees, E.D., and Huggins, C.,
Steroid Influences on Respiration, Glycolysis, and Levels
of Pyridine-linked Dehydrogenases of Experimental Mammary
Cancer.
Cancer Res. 20 963-71 1960.

132. Ressler, N.,
Interpretation of Subbands of Lactic Dehydrogenase Iso-
zymes.
Nature 215/5098 284-85 1967.

133. Richterich, R., Gautier, E., Egli, W., Zuppinger, K.
und Rossi, E.,
Progressive Muskeldystrophie. I. Mitteilung: Die Hetero-
genität der Serum Lactat Dehydrogenase.
Klin. Wschr. 7 346-52 1961.

134. Richterich, R.,
Diagnostic Significance of Heterogenous Lactic
Dehydrogenases in Malignant Effusions.
Nature 191 507-508 1961.

135. Richterich, R.,
Die Differentialdiagnose maligner und benigner Ergüsse
durch Bestimmung der LDH-Isoenzyme.
Med. Wschr. 92 919-20 1962.

136. Rosa, J., and Schapira, F.,
LDH-Isozymes and Aging of Erythrocytes.
Nature 204 4961-63 1964.

137. Rosado, A., Morris, H.P., and Weinhouse, S.,
Lactate Dehydrogenase Subunits in Normal and Neoplastic
Tissues of the Rat.
Cancer Res. 29 1673-80 1969.

138. Sabato Di, G., and Kaplan, N.O.,
The Role of Sulfhydryl-Groups of Lactic Dehydrogenases.
Biochemistry 2/4 776-81 1963.

139. Sabato Di, G., and Ottesen, M.,
Effect of Coenzymes on the Hydrogen-Deuterium Exchange of
Chicken Heart LDH, as Measured by Infrared Spectrophotometry.
Biochemistry 4/3 422-28 1965.

140. Sacktor, B., and Dick, A.R.,
Alpha-Glycerophosphate and Lactic Dehydrogenases of
Hematopoietic Cells from Leukemic Mice.
Cancer Res. 20 1408-12 1960.

141. Schoenberger, G.A., and Wacker, W.E.C.,
Peptide Inhibitors of LDH. XI. Specific Inhibition of
LDH-M₄ and LDH-H₄ by Inhibitor Peptides I and II.
Biochem. Biophys. Res. Commun. 22/3 291-96 1966.

142. Schoenberger, G.A., and Wacker, W.E.C.,
Peptide Inhibitors of LDH. II. Isolation and
Characterization of Peptides I and II.
Biochemistry 5/4 1375-79 1966.
143. Schmähel und v. Stackelberg, S.,
Der Einfluß von Lactoflavin, Nicotinsäureamid oder
Dipyridamol auf die cancerogene Wirkung von Diäthylnitro-
samin bei Ratten.
Arzneimittelforsch. 18 318-19 1968.
- 144a. Schmidt, C.G.,
Cancerostase durch alkylierende Cytostatica und Tumor-
glykolyse in vivo.
Klin. Wschr. 45 188-91 1967.
144. Schmidt, F.W.,
Enzym-Fibel.
145. Schmidt, F.W.,
Pathophysiologische Grundlagen zur Interpretation von
Enzym-Bestimmungen.
Die ärztliche Fortbildung, J.F. Lehmann Verlag München
7 268-69 1971.
146. Schmidt, E.,
Enzym-Muster bei Erkrankungen.
Die ärztliche Fortbildung. J.F. Lehmanns Verlag München
7 270-72 1971.
147. Schmukler, M., and Barrows Jr., H.C.,
Age Differences in Lactic and malic Dehydrogenases in
the Rat.
J. Geront. 21/1 109-11 1966.
148. Schneider, W.C.,
Enzymes of Cancer Nuclei. In: H. Busch, The Nucleus of the
Cancer Cell.
Exptl. Cell Res. Suppl. 9 450-54 1965.
149. Shaw, C.R., and Barto, E.,
Genetic Evidence for the Subunit Structure of Lactic
Dehydrogenase Isozymes.
Proc. Nat. Acad. Sci. 50 211-14 1963.
150. Siebert, G.,
Enzyme und Substrate der Glykolyse in isolierten Zell-
kernen.
Biochem. Z. 334 369-88 1961.
151. Siebert, G., Bässler, K.H., Hannover, R., Adloff, E. und
Beyer, R.,
Enzymaktivitäten in isolierten Zellkernen in Abhängigkeit
von der mitotischen Aktivität.
Biochem. Z. 334 388-92 1961.

152. Siebert, G.,
Nuclear Enzymes, Especially those of Energy Metabolism.
In: The Cell Nucleus, Butterworths Scientific Publ.
176-84 1960.
153. Siebert, G.,
Enzymes of Cancer Nuclei. In: H. Busch, The Nucleus of the
Cancer Cell.
Exptl. Cell Res. Suppl. 9 389-417 1963.
154. Sorof, S., Young, E. M., McCue, M. M., and Fetterman, P. L.,
Zonal Electrophoresis of the Soluble Proteins of Liver
and Tumor in Azo-Dye Carcinogenesis.
Cancer Res. 23 864-82 1963.
155. Stambaugh, R., and Rost, D.,
Substrate and Product Inhibition of Rabbit Muscle Lactic
Dehydrogenase Heart (H_4) and Muscle (M_4) Isozymes.
J. Biol. Chem. 241/2 1462-67 1966.
156. Starkweather, W. H., and Schoch, H. K.,
Some Observations on the Lactic Dehydrogenase of Human
Neoplastic Tissue.
Biochim. Biophys. Acta 62 440-42 1962.
157. Steck, T. L., Kaufman, S., and Bader, J. P.,
Glykolysis in Chick Embryo Cell Cultures Transformed by
Rous Sarcoma Virus.
Cancer Res. 28 1611-19 1968.
158. Streffer, C.,
Strahlen-Biochemie.
Heidelberger Taschenbücher, Springer Verlag Berlin,
Heidelberg, New York 1969.
159. Sund, H. und Weber, K.,
Die Quartärstruktur der Proteine.
Angew. Chemie 78 217 1966.
160. Sontzoff, V., and Davenport, G. R.,
The Protein Profiles of Primary Tumors and their Lung
Metastases.
Cancer Res. 25 896-901 1965.
161. Süß, R., Kinzel, V. und Scribner, J. D.,
Krebs-Experimente und Denkmodelle.
Heidelberger Taschenbücher Springer Verlag Berlin, Heidel-
berg, New York 1970.
162. Thiele, K. G., and Mattenheimer, H.,
The Isozymes of Lactate Dehydrogenase in the Nephron of
the Healthy Human Kidney.
Z. Klin. Chem. Klin. Biochem. 6/3 132-38 1968.

163. Tiedemann, H. und Born, J.,
Versuche zum Mechanismus der Pasteur-Reaktion. Der Ein-
fluß von Phosphat-Ionen auf die Aktivität der struktur-
gebundenen Hexokinase.
Z.Naturforsch. 14b 477-78 1959.
164. Umbarger, H.E.,
Evidence for a Negative Feedback Mechanism in the
Biosynthesis of Isoleucine.
Science 123 848 1956.
165. Vesell, E.S.,
Significance of the Heterogeneity of Lactic Dehydrogenase
Activity in Human Tissues.
Ann.N.Y.Acad.Sci. 94/3 877-89 1961.
- 165a. Vesell, E.S., and Bearn, A.G.,
Localization of Lactic Acid Dehydrogenase in Serum
Fractions.
Proc.Soc.Exptl.Biol.Med. 94 96-99 1957.
166. Vesell, E.S., Philipp, J. and Bearn, A.G.,
Comparative Studies on the Isozymes of Lactic Dehydro-
genase in Rabbit and Man.
J.Exptl.Med. 116 797-806 1962.
167. Vesell, E.S.,
Formation of Human LDH Isozyme Patterns in Vitro.
Proc.Nat.Acad.Sci. 45/1 111-117 1965.
168. Vesell, E.S., and Philipp, J.,
Isozymes of LDH: Sequential Alterations during
Development.
Ann.N.Y.Acad.Sci. 111/1 346-48 1963.
169. Vesell, E.S.,
LDH Isozymes: Substrate Inhibition in Various Human
Tissues.
Science 150 1590-93 1965.
170. Veitch, F.P.,
Competitive Shunt Mechanism.
Biochim.Biophys.Acta 86 21-25 1964.
171. Wachsmuth, E.D.,
Wirkung von Ploidiestufen auf die Differenzierung von
Enzymen am Beispiel der Lactatdehydrogenase-Isoenzyme
des Menschen.
Klin.Wschr. 43/2 69-72 1965.
172. Wachsmuth, E.D. und Pfeleiderer, G.,
Biochemische Untersuchungen an kristallinen Isoenzymen
der LDH aus menschlichen Organen.
Biochem.Z. 336 345-56 1963.

173. Wachsmuth, E.D., Pfleiderer, G. und Wieland, Th.,
Aminosäurenzusammensetzung von Isozymen aus menschlichen
und tierischen Organen.
Biochem. Z. 340 80-94 1964.
174. Wachsmuth, E.D.,
Immunologische Spezifität von LDH-Isozymen dreier Säu-
getierorganismen.
Biochim. Biophys. Acta 92 248-54 1964.
175. Wakim, K.G., and Fleisher, G.A.,
Relationship of the Reticulo-endothelial System to
Activities and Disappearance-Rates of Various Enzyme.
J. Lab. clin. Med. 61 107-13 1963.
176. Warburg, O.,
Der Stoffwechsel der Tumoren.
Berlin, Springer Verlag 1926.
- 176a. Warburg, O.,
On Respiratory Impairment in Cancer Cells.
Science 124 268-70 1956.
177. Warburg, O., Gawehn, K. und Geißler, A.W.,
Manometrie der Körperzellen unter physiologischen Bedingun-
gen.
Z. Naturforsch. 12b 115-18 1957.
178. Warburg, O., Gawehn, K., Geißler, A.W., Kayser, D. und
Lorenz, S.,
Experimente zur Anaerobiose der Krebszellen.
Klin. Wschr. 43 289-93 1965.
- 178a. Warburg, O.,
On the Origin of cancer Cells Science 123 309-14 1956.
179. Weber, G., and Ashmore, J.,
Absent Fructose-1,6-Diphosphatase Activity in Hepatoma.
Exptl. Cell Res. 14 226-28 1958.
180. Weber, G., Banerjee, G., and Morris, H.P.,
Comparative Biochemistry of Hepatomas. I. Carbohydrate
Enzymes in Morris Hepatoma. 5123.
Cancer Res. 21 933-37 1961.
181. Weber, G., and Morris, H.P.,
Comparative Biochemistry of Hepatomas. III. Carbohydrate
Enzymes in Liver Tumors of Different Growth Rates.
Cancer Res. 23 987-94 1963.
182. Weber, G.,
Introductory Remarks on some Basic Concepts in Neoplasia.
Cancer Res. 23 1471-73 1963.

183. Weber, G., and Pflleiderer, G.,
Isoenzymes in the Human Epidermis.
Ann. N.Y. Acad. Sci. 94/3 933-36 1961.
184. Weinhouse, S.,
On Respiratory Impairment in Cancer Cells.
Science 124 267-68 1956.
185. Weinhouse, S.,
Discussion of Dr. Greensteins Paper.
Cancer Res. 16 654-57 1956.
186. Weinhouse, S.,
Oxidative Metabolism of Neoplastic Tissues.
Adv. Cancer Res. III 269-335 1955.
187. Wenner, C.E., Spirtes M.A., and Weinhouse, S.,
Metabolism of Neoplastic Tissue. II. A Survey of Enzymes
of the Citric Acid Cycle in Transplanted Tumors.
Cancer Res. 12 44-49 1952.
188. White, L.P.,
Serum Enzymes. II. Glycolytic Enzymes in Patients with
Cancer and other Diseases.
J. Natl. Cancer Inst. 21 671-84 1958.
189. White, L.P.,
Serum Enzymes. III. The Significance of Abnormalities of
Glycolytic Enzymes in the Serum of Cancer Patients.
J. Natl. Cancer Inst. 21 655-96 1958.
190. Wieland, T. und Pflleiderer, G.,
Nachweis der Heterogenität von Milchsäuredehydrogenasen
verschiedenen Ursprungs durch Trägerelektrophorese.
Biochem. Z. 329 112-16 1957.
191. Wieland, T., Pflleiderer, G., Haupt, J. und Wörner, W.,
Über die Verschiedenheit der Milchsäuredehydrogenasen:
IV. Quantitative Ermittlung einiger Enzymverteilungsmuster.
Vergleichende Betrachtung bei verschiedenen
Wirbeltierklassen.
Biochem. Z. 332 1-10 1959.
192. Wieland, T. und Pflleiderer, G.,
Differente und multiple Formen von Enzymen.
Angew. Chemie 74 261-63 1962.
193. Wieland, T., Pflleiderer, G. und Ortlanderl, F.,
Über die Verschiedenheit der Milchsäuredehydrogenasen.
III. Vergleiche der MDH aus verschiedenen Rattenorganen.
Biochem. Z. 331 103-12 1959.

194. Wieme, R.J.,
Agar-Gel-Electrophoresis, Techniques, applications.
Arscia Uitgaven N.V. Brussels, Belgium 1958.
195. Wilkinson, J.H., and Withycombe, W.A.,
Organ Specificity and LDH-Activity. Some Properties of Human
Spermatozoal LDH.
Biochem.J. 97/3 663-68 1965.
196. Wilkinson, J.H., and Withycombe, W.A.,
The Substrate Specificities of the LDH-Isozymes of
Dystrophic Muscle.
Biochem.J. 93/3 1414-25 1964.
197. Wilson, A.C., Cahn, R.D., and Kaplan, N.O.,
Function of the Two Forms of Lactic Dehydrogenase in the
Breast Muscle of Birds.
Nature 197 331-34 1963.
198. Withycombe, W.A., and Wilkinson, J.H.,
Some Properties of Human Spermatozoal LDH-Isozymes.
Biochem.J. 93/3 11P-12P 1964.
199. Withycombe, W.A., Plummer, D.T., and Wilkinson, J.H.,
Organ Specificity and LDH-Activity. Differential Inhibition
by Urea and Related Compounds.
Biochem.J. 94/2 384-89 1965.
200. Wolff, H.,
Die Isoenzymverteilung der LDH in der normalen und der
dem Tumor angrenzenden Schleimhaut sowie im Krebsgewebe
des Magens und Dickdarms.
Arch.Geschwulstforsch. 34/35 188-97 1969/70.
201. Wroblewski, F., and Gregory, E.F.,
Lactic Dehydrogenase Isozymes and their Distribution in
Normal Tissues and Plasma and in Disease States.
Ann.N.Y.Acad.Sci. 94/3 912-32 1961.
202. Wroblewski, F., and LaDue, J.S.,
Lactic Dehydrogenase Activity in Blood.
Proc.Soc.Exptl.Biol.Med. 90 210-15 1955.
203. Wu, R., and Racker, E.,
Regulatory Mechanism in Carbohydrate Metabolism.
III. Limiting Factors in Glycolysis of Ascites Tumor
Cells.
J.Biol.Chem. 234 1029-35 1959.
204. Wu, R., and Racker, E.,
IV. Pasteur Effect and Crabtree Effect in Ascites Tumor
Cells.
J.Biol.Chem. 234 1036-41 1959.

205. Wüst,H., Arnold,E. und Schön,H.,
Die thermische Inaktivierung von Serum- und Organlaktat-
dehydrogenasen als Methode zur Isoenzymtrennung.
Klin.Wschr. 43/9 500-504 1965.
206. Wüst,H.,
Serumisoenzyme der LDH bei Kranken mit malignen Tumoren.
Verhdlgn.der deutsch.Gesellsch.f.Inn.Med. 71 949 1965.
207. Zewe,V., and Fromm,H.J.,
Kinetic Studies of Rabbit Muscle LDH. II. Mechanism of
the Reaction.
Biochemistry 4/4 782-92 1965.
208. Ziegenbein,R.,
Isoenzyme in Lebermetastasen.
Klin.Wschr. 24 1337-40 1965.
209. Zuppinger,K., Richterich,R. und Rossi,E.,
Die diagnostische Bedeutung der Heterogenität der Serum
LDH.
Schw.med.Wschr. 92 169-77 und 198-202 1962.

Ich danke Herrn Prof.Dr.Heß für die Überlassung
des Themas, sowie Herrn Oberarzt Dr.Buchelt
für Rat und Beistand beim Werdegang der Arbeit.

Lebenslauf

Am 8.2.1945 wurde ich, Wilhelm Schultheis, als zweiter Sohn des damaligen Soldaten Wilhelm Schultheis und seiner Ehefrau Marie Schultheis, geb. Semmel, in Langenselbold, Kreis Hanau, geboren. Gegen Ende des Krieges fiel mein Vater.

Von Ostern 1951 bis Ostern 1955 besuchte ich die Volksschule in Langenselbold, von 1955 bis 1965 die HOHE LANDESSCHULE in Hanau, wo ich am 17.2.1965 das Abitur des sprachlichen Zweiges bestand.

Seit dem Sommersemester 1965 studierte ich an der PHILIPPS-UNIVERSITÄT in Marburg Medizin. Dort bestand ich auch am 21.3.1966 die naturwissenschaftliche, am 15.9.1967 die ärztliche Vorprüfung und am 15.12.1970 die ärztliche Prüfung.

Meine Medizinalassistentenzeit begann ich am 1.2.1971 und leistete sie in der Universitäts-Strahlenklinik und der Medizinischen Universitäts-Poliklinik Marburg sowie auf der chirurgischen Abteilung des Kreiskrankenhauses in Dillenburg ab.

Nach erfolgter Bestallung als Arzt wurde ich am 29.2.1972 zur Ableistung meines Militärdienstes zur Bundeswehr einberufen.

Meine akademischen Lehrer waren die Herren Professoren und Dozenten:

Beckmann, Berendes, Bommer, Brück, Buchholz, Dimroth, Dittrich, Dölle, Exner, Gedigk, Golenhofen, Hardewig, Hensel, Herrmann, Heß, Heuser, Hildebrandt, Hohorst, Hort, Jakob, Kamke, Kaffarnik, Karlson, Knauff, Koch, Koransky, Lang, Lehmann-Grube, Linneweh, Lübbers, Mahr, Mann, Martini, Mattes, du Mesnil de Rochemont, Petry, Pots, Rodeck, Rodenhäuser, Rohen, Rupec, Schiff, Schirren, Schleyer, Schmid, Schmitz-Moormann, Schwaiger, Seidel, F., Seidel, W., Siegert, Siess, Spiegelberg, v. Stosch, Straub, Strohmeier, Vogt, Voß, Walcher, Wendt, Willenbockel, Zilliken.

